

Original document

# NONREDUCING SUGAR FORMING ENZYME, TREHALOSE LIBERATING ENZYME, AND PRODUCTION OF SUGAR USING THE ENZYMES

Patent number: JP2000228980  
Publication date: 2000-08-22  
Inventor: YAMAMOTO TAKUO; MARUTA KAZUHIKO;  
KUBOTA MICHIO; FUKUDA YOSHIATSU; MIYAKE  
TOSHIO  
Applicant: HAYASHIBARA BIOCHEM LAB  
Classification:  
- international: C12N9/24; C12N9/90; C12P19/14; C12P19/18;  
C12N9/24; C12N9/90; C12P19/00; (IPC1-7): C12N9/24;  
C12N1/21; C12N15/09; C12P19/12; C12N9/24; C12R1/19;  
C12N1/21; C12R1/19; C12N15/09; C12R1/06  
- european:  
Application number: JP19990016931 19990126  
Priority number(s): JP19990016931 19990126; JP19980258394 19980911;  
JP19980352252 19981211

Also published as:

EP0990704 (A2)  
 EP0990704 (A3)  
 CN1504567 (A)  
 CN1180081C (C)

[View INPADOC patent family](#)[Report a data error](#)

## Abstract of JP2000228980

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new nonreducing sugar forming enzyme having an activity for forming a nonreducing sugar having a trehalose structure at its terminal from a reductive partially decomposed product of starch, having an optimal temperature in a medium temperature region and capable of giving trehalose for foods, cosmetics, pharmaceuticals or the like at a low cost. **SOLUTION:** A new nonreducing sugar forming enzyme having an activity for forming a nonreducing sugar having trehalose structure at its terminal from a reductive partially decomposed product of starch and having the optimal temperature in a medium temperature region. This enzyme is effectively used in the production of a trehalose structure-having nonreducing sugar including trehalose in a medium temperature and acidic region. The nonreducing sugar exhibits no reducing activity, has water holding property and can be compounded in a food and drink, a cosmetic, a pharmaceutical or the like. The enzyme can be produced by culturing a microorganism having a nonreducing sugar forming enzyme-producing activity [e.g. *Arthrobacter* sp. S34 (FERM BP-6450)] to produce the enzyme in the culture mixture, and subsequently collecting it from the culture mixture.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

Description of corresponding document: EP0990704



(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-228980

(P 2 0 0 0 - 2 2 8 9 8 0 A)

(43) 公開日 平成12年8月22日(2000.8.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コード (参考)
C12N 9/24		C12N 9/24	4B024
1/21		1/21	4B050
15/09	ZNA	C12P 19/12	4B064
C12P 19/12		C12N 15/00	ZNA A 4B065
//(C12N 9/24			

審査請求 未請求 請求項の数56 O L (全55頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-16931	(71) 出願人	000155908 株式会社林原生物化学研究所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
(22) 出願日	平成11年1月26日(1999.1.26)	(72) 発明者	山本 拓生 岡山県岡山市桑野525番3
(31) 優先権主張番号	特願平10-258394	(72) 発明者	丸田 和彦 岡山県岡山市桑野525番3
(32) 優先日	平成10年9月11日(1998.9.11)	(72) 発明者	久保田 倫夫 岡山県岡山市四御神1番30
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	福田 恵温 岡山県岡山市阿津2189番地
(31) 優先権主張番号	特願平10-352252	(72) 発明者	三宅 俊雄 岡山県岡山市伊島町1丁目3番23号
(32) 優先日	平成10年12月11日(1998.12.11)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素ならびに該酵素を用いる糖質の製造方法

## (57) 【要約】

【課題】 中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素ならびに斯かる酵素を用いる糖質の製造方法の提供を課題とする。

【解決手段】 中温域に至適温度を有する新規な非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素ならびに、斯かる非還元性糖質生成酵素及び／又は斯かるトレハロース遊離酵素を還元性澱粉部分分解物に作用させて非還元性糖質を生成させる工程と、該工程で生成した非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を採取する工程とを含む糖質の製造方法の提供により解決する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有し、中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素。

【請求項2】40℃を越え且つ60℃未満の範囲に至適温度を有する請求項1に記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項3】酸性域に至適pHを有する請求項1又は2に記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項4】配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する請求項1、2又は3に記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項5】配列表における配列番号2又は3に示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する請求項1乃至4のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項6】配列表における配列番号4乃至6に示すアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列の一部又は全てを含有する請求項1乃至5のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項7】微生物に由来する請求項1乃至6のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項8】微生物がアルスロバクター属に属する細菌である請求項7に記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項9】微生物がアルスロバクター・スピーシーズS34（工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号FERM BP-6450）又はその変異株である請求項7又は8に記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項10】アルスロバクター・スピーシーズS34（工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号FERM BP-6450）又は、請求項1乃至9に記載の非還元性糖質生成酵素の産生能を有する該微生物の変異株から得ることのできる、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有する非還元性糖質生成酵素。

【請求項11】請求項1乃至10のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素をコードするDNAを発現させて得ることのできる、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有する非還元性糖質生成酵素。

【請求項12】配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列と57%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有する非還元性糖質生成酵素。

【請求項13】下記の理化学的性質を有する請求項1乃至12のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素。

## (1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

## (2) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、約75,000±10,000ダルトン。

## (3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約4.5±0.5。

## (4) 至適温度

pH6.0、60分間反応で、約50℃付近。

## (5) 至適pH

50℃、60分間反応で、pH約6.0付近。

## (6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、約55℃付近まで安定。

## (7) pH安定性

4℃、24時間保持で、pH約5.0乃至約10.0の範囲で安定。

【請求項14】請求項1乃至13のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素をコードするDNA。

【請求項15】配列表における配列番号7に示す塩基配列又は当該塩基配列に相補的な塩基配列の一部又は全てを含有する請求項14に記載のDNA。

【請求項16】配列表における配列番号8に示す塩基配列の一部又は全てをさらに含有する請求項14又は15に記載のDNA。

【請求項17】遺伝子の縮重に基づき、コードするアミノ酸配列を変更することなく、塩基の1又は2以上を他の塩基で置換した請求項14、15又は16に記載のDNA。

【請求項18】自律複製可能なベクターに挿入された請求項14乃至17のいずれかに記載のDNA。

【請求項19】適宜の宿主に導入された請求項14乃至18のいずれかに記載のDNA。

【請求項20】請求項1乃至13のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素の産生能を有する微生物を培養して培養物中に該酵素を産生せしめる工程と、該培養物から該酵素を採取する工程を含んでなる非還元性糖質生成酵素の製造方法。

【請求項21】微生物がアルスロバクター属に属する細菌である請求項20に記載の非還元性糖質生成酵素の製造方法。

【請求項22】微生物がアルスロバクター・スピーシーズS34（工業技術院生命工学工業技術院、受託番号FERM BP-6450）又は、請求項1乃至13のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素の産生能を有する該微生物の変異株である請求項20又は21に記載の非還元性糖質生成酵素の製造方法。

【請求項23】微生物が請求項1乃至13のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素をコードするDNAを適宜の宿主微生物に導入してなる形質転換体である請求項20、21又は22に記載の非還元性糖質生成酵素の製造

方法。

【請求項 24】培養物を細胞壁破壊酵素で処理し、該処理を施した培養物から該酵素を採取する請求項 20 乃至 23 のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素の製造方法。

【請求項 25】産生した非還元性糖質生成酵素を透析、塩析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動から選ばれる 1 種又は 2 種以上の精製方法により採取する請求項 20 乃至 24 のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素の製造方法。

【請求項 26】末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有し、中温域に至適温度を有するトレハロース遊離酵素。

【請求項 27】45℃を越え且つ 60℃未満の範囲に至適温度を有する請求項 26 に記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 28】酸性域に至適 pH を有する請求項 26 又は 27 に記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 29】配列表における配列番号 9 に示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する請求項 26、27 又は 28 に記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 30】配列表における配列番号 10 乃至 13 に示すアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列の一部又は全てを含有する請求項 26 乃至 29 に記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 31】配列表における配列番号 14 乃至 16 に示すアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列の一部又は全てを含有する請求項 26 乃至 30 のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 32】微生物に由来する請求項 26 乃至 31 のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 33】微生物がアルスロバクター属に属する細菌である請求項 32 に記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 34】微生物がアルスロバクター・スピーシーズ S34 (工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号 FERM BP-6450) 又はその変異株である請求項 32 又は 33 に記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 35】アルスロバクター・スピーシーズ S34 (工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号 FERM BP-6450) 又は、請求項 26 乃至 34 に記載のトレハロース遊離酵素の産生能を有する該微生物の変異株から得ることのできる、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有するトレハロース遊離酵素。

【請求項 36】請求項 26 乃至 35 のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素をコードする DNA を発現させて得ることのできる、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有するトレハロース遊離酵素。

【請求項 37】配列表における配列番号 9 に示すアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有するトレハロース遊離酵素。

【請求項 38】下記の理化学的性質を有する請求項 26 乃至 37 のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素。

(1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する。

(2) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、約 62,000 ± 5,000 ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI 約 4.7 ± 0.5。

(4) 至適温度

pH 6.0、30 分間反応で、約 50℃乃至約 55℃付近。

(5) 至適 pH

50℃、30 分間反応で、pH 約 6.0 付近。

(6) 温度安定性

pH 7.0、60 分間保持で、約 50℃付近まで安定。

(7) pH 安定性

4℃、24 時間保持で、pH 約 4.5 乃至約 10.0 の範囲で安定。

【請求項 39】請求項 26 乃至 38 のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素をコードする DNA。

【請求項 40】配列表における配列番号 17 に示す塩基配列又は当該塩基配列に相補的な塩基配列の一部又は全てを含有する請求項 39 に記載の DNA。

【請求項 41】配列表における配列番号 8 に示す塩基配列の一部又は全てをさらに含有する請求項 40 に記載の DNA。

【請求項 42】遺伝子の縮重に基づき、コードするアミノ酸配列を変更することなく、塩基の 1 又は 2 以上を他の塩基で置換した請求項 39、40 又は 41 に記載の DNA。

【請求項 43】自律複製可能なベクターに挿入された請求項 39 乃至 42 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 44】適宜の宿主に導入された請求項 39 乃至 43 のいずれかに記載の DNA。

【請求項45】請求項26乃至38のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素の生産能を有する微生物を培養して培養物中に該酵素を産生せしめる工程と、該培養物から該酵素を採取する工程を含んでなるトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項46】微生物がアルスロバクター属に属する細菌である請求項45に記載のトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項47】微生物がアルスロバクター・スピーシーズS34（工業技術院生命工学工業技術院、受託番号FERM BP-6450）又は、請求項26乃至38のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素の生産能を有する該微生物の変異株である請求項45又は46に記載のトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項48】微生物が請求項26乃至38のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素をコードするDNAを適宜の宿主微生物に導入してなる形質転換体である請求項45、46又は47に記載のトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項49】培養物を細胞壁破壊酵素で処理し、該処理を施した培養物から該酵素を採取する請求項45乃至48のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項50】産生したトレハロース遊離酵素を透析、塩析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動から選ばれる1種又は2種以上の精製方法により採取する請求項45乃至49のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項51】アルスロバクター・スピーシーズS34（工業技術院生命工学工業技術院、受託番号FERM BP-6450）及びその変異株から選ばれる微生物。

【請求項52】還元性澱粉部分分解物に請求項1乃至13のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素及び／又は請求項26乃至38のいずれかに記載のトレハロース遊離酵素を作用させて非還元性糖質を生成させる工程と、該工程で生成した非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を採取する工程とを含んでなる糖質の製造方法。

【請求項53】還元性澱粉部分分解物が、澱粉又は澱粉質に酸及び／又は澱粉加水分解酵素を作用させて得られるグルコース重合度3以上の還元性澱粉部分分解物である請求項52に記載の糖質の製造方法。

【請求項54】非還元性糖質を生成させる工程において、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、澱粉枝切り酵素、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ及び／又は $\alpha$ -グルコシダーゼをさらに作用させる請求項52又は53に記載の糖質の製造方法。

【請求項55】非還元性糖質がトレハロース、 $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース又は $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースである請求項52、53又は54に記載の糖質の製造方法。

【請求項56】トレハロースが含水結晶又は無水結晶である請求項55に記載の糖質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素ならびに該酵素を用いる糖質の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】トレハロースは2分子のグルコースが還元性基同士で結合してなる二糖類であり、自然界においては、細菌、真菌、藻類、昆虫、甲殻類などに広く分布している。トレハロースは、還元性を示さず、且つ、水分保持作用を有する有用性の高い糖質として古くより知られ、食品、化粧品、医薬品をはじめとする広範な分野での用途が期待されてきた。しかしながらトレハロースは、その効率的な製造方法がかつては確立されていなかったために、その期待の大きさに反して利用の範囲は極めて限られていた。このことから、斯界においては、トレハロースが安価に供給されることが待ち望まれていた。

【0003】先に、本発明者らは、鋭意研究の結果、斯かる要望に応える提案のひとつとして、澱粉原料から酵素的にトレハロースを生成させるトレハロースの製造方法を確立した。この方法は、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有する非還元性糖質生成酵素と、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有するトレハロース遊離酵素とを、還元性澱粉部分分解物に作用させることを特徴とする。これらの酵素ならびに当該酵素を用いるトレハロースを含む糖質の製造方法は、同じ特許出願人による特開平7-143876号公報、特開平7-213283号公報、特開平7-322883号公報、特開平7-298880号公報、特開平8-66187号公報、特開平8-66188号公報、特開平8-73504号公報、特開平8-84586号公報及び特開平8-336388号公報に開示されている。斯くしてトレハロースの安価な供給への道が拓かれた。

【0004】更に、この研究の過程で、斯かる非還元性糖質生成酵素が、従来の還元性澱粉部分分解物の抱える問題点を解消し得る新規な非還元性糖質の製造にも有用であるという独自の知見も見出された。各種デキストリンや各種マルトオリゴ糖などの還元性澱粉部分分解物

は、甘味料やエネルギー用糖源などとして有用である一方、その還元力故に反応性に富み、アミノ酸や蛋白質との共存下では褐変しやすく、品質が劣化しやすいことが問題となっていた。斯かる問題を解消し得る唯一の方法として、還元性澱粉部分分解物を高圧水素添加法などにより糖アルコールに変換する方法が知られていた。然るに、斯かる方法の実施には多量の熱量が必要な上、水素を使用することから、安全面を考慮に入れた設備を必要とし、結果として、多大な費用と労力を要することにつながっている。これに対し、上記の非還元性糖質生成酵素は、上記でも示したように、還元性澱粉部分分解物に作用して、末端部にトレハロース構造を有する非還元性の糖質を生成する作用を有しており、この作用は酵素作用故に温和な条件下で進行するものである。この作用を利用して、本発明者らは、当該酵素を用いる、従来の還元性澱粉部分分解物における問題点を解消し得る新規な非還元性糖質の効率的な製造方法の確立にも至った。以上によってトレハロースならびに非還元性糖質の用途開発が各方面で盛んになり、その結果、斯かる糖質の用途が多様化するとともに、その需要は諸種の分野において現在急速に伸びつつある。

【0005】このような状況下、トレハロースならびにトレハロース構造を有する非還元性糖質の製造のさらなる効率化への期待が斯界では高まっている。斯かる期待に応える方策のひとつは、様々な至適条件を有する非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素を確立し、製造に使用可能な酵素の幅広い給源を提供することにある。これによって、目的とする糖質の製造に併用される他の酵素の至適条件や製造設備、製造する糖質の最終用途などによって要求される製造条件に応じて、多種の酵素の中から最適のものを選択することができ、より効率的な糖質の製造が可能なものとなる。然るに、現在までに開示された非還元性糖質生成酵素は、その至適温度に基づいて分類すると、約40℃以下という比較的低温域に至適温度を有する酵素群と、約60℃以上という比較的高温域に至適温度を有する酵素群とに分けられる。また、現在までに開示されたトレハロース遊離酵素は、同様に分類すると、約45℃以下という比較的低温域に至適温度を有する酵素群と、約60℃以上という比較的高温域に至適温度を有する酵素群とに分けられる。これに対して、例えば、50℃付近というような中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素についてはいずれも未だ開示がない。

【0006】澱粉原料からの糖質の製造に用いられる糖質関連酵素において、主要なある種の酵素群は中温域に至適温度を有している。これらの酵素は、上記トレハロースならびに非還元性糖質の製造においても必要とされる場合がある。然るに、中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素は未だ確立されていないために、これら両酵素のいずれか一方又は

双方とともに、上記の如き糖質関連酵素を併用する糖質の製造は、未だ充分に効率的と言えるものが確立されてはいない。また、糖質の製造設備や糖質の最終用途によっては、製造における酵素反応の温度として中温域が要求される場合がある。このような場面に対応し得る、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を用いる効率的な糖質の製造方法も未だ確立されていると言える状況にはない。以上のことから、斯界においては、中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素が確立され、斯かる酵素を用いる、非還元性糖質を含む糖質の製造方法が確立されることが待ち望まれている。

【0007】斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素を提供することにある。

【0008】この発明の第二の課題は、斯かる非還元性糖質生成酵素をコードするDNAを提供することにある。

【0009】この発明の第三の課題は、斯かる非還元性糖質生成酵素の製造方法を提供することにある。

【0010】この発明の第四の課題は、中温域に至適温度を有するトレハロース遊離酵素を提供することにある。

【0011】この発明の第五の課題は、斯かるトレハロース遊離酵素をコードするDNAを提供することにある。

【0012】この発明の第六の課題は、斯かるトレハロース遊離酵素の製造方法を提供することにある。

【0013】この発明の第七の課題は、斯かる非還元性糖質生成酵素及び／又は斯かるトレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物を提供することにある。

【0014】この発明の第八の課題は、斯かる非還元性糖質生成酵素及び／又は斯かるトレハロース遊離酵素を用いる、非還元性糖質を含む糖質の製造方法を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決し得る酵素を産生する微生物を土壌より広く検索した。その結果、兵庫県赤穂市の土壌から新たに分離した微生物が上記課題を解決し得る酵素を産生することを見出した。当該微生物より目的とする非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素をそれぞれ単離し、それらの性質を決定したところ、単離されたこれらの酵素は、いずれも中温域に至適温度を有することが確認された。一方、当該微生物を同定したところ、アルスロバクター（*Arthrobacter*）属に属する新規微生物であることが確認され、アルスロバクター・スピーシーズS34と命名された。なお、アルスロバクター・スピーシーズS34は、平成10年8月6日付けで、茨城県つくば市東1丁目1番3号、通商産業省工業

技術院生命工業技術研究所、特許微生物寄託センターに、微生物受託番号FERM BP-6450を付して受託された。

【0016】本発明者らは、さらに鋭意研究を続け、上記で確認された酵素をコードするDNAをアルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450)より単離し、その塩基配列を解読して、当該酵素のアミノ酸配列を決定した。また、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450)ならば、先に得たDNAを常法にしたがい微生物に導入して得た形質転換体は、いずれも所望量の酵素を産生し得ることが確認された。斯くして得られる両酵素は、いずれも、トレハロースならびにトレハロース構造有する非還元性糖質を含む糖質の中温域での製造に有利に用い得るものであることも確認された。この発明は以上の知見に基づき完成されたものである。

【0017】すなわち、この発明は、前記第一の課題を、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成し、中温域に至適温度を有する新規な非還元性糖質生成酵素により解決するものである。

【0018】この発明は、前記第二の課題を、斯かる非還元性糖質生成酵素をコードするDNAにより解決するものである。

【0019】この発明は、前記第三の課題を、斯かる非還元性糖質生成酵素の産生能を有する微生物を培養し、産生した非還元性糖質生成酵素を培養物から採取することを特徴とする非還元性糖質生成酵素の製造方法により解決するものである。

【0020】この発明は、前記第四の課題を、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解し、中温域に至適温度を有する新規なトレハロース遊離酵素により解決するものである。

【0021】この発明は、前記第五の課題を、斯かるトレハロース遊離酵素をコードするDNAにより解決するものである。

【0022】この発明は、前記第六の課題を、斯かるトレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物を培養し、産生した非還元性糖質生成酵素を培養物から採取することを特徴とするトレハロース遊離酵素の製造方法により解決するものである。

【0023】この発明は、前記第七の課題を、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450)及びその変異株から選ばれる微生物により解決するものである。

【0024】この発明は、前記第八の課題を、当該非還元性糖質生成酵素及び／又は当該トレハロース遊離酵素を還元性澱粉部分分解物に作用させて非還元性糖質を生

成させる工程と、該工程で生成した非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を採取する工程とを含んでなる糖質の製造方法により解決するものである。

【0025】

【発明の実施の形態】この発明は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素ならびに該酵素のいずれか一方又は双方を用いる糖質の製造方法に関するものである。本明細書でいう非還元性糖質生成酵素とは、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有する酵素を意味する。本明細書でいうトレハロース遊離酵素とは、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有する酵素を意味する。本明細書でいう中温域とは、酵素反応による澱粉原料からの糖質の製造において通常用いられる反応温度における中間域を意味する。因みに、斯かる製造においては、多くの場合、約10℃乃至約100℃又はその前後の範囲の種々の反応温度が用いられる。この発明の非還元性糖質生成酵素とは、非還元性糖質生成酵素としての作用を有し、中温域、望ましくは、40℃を越え且つ60℃未満の範囲に至適温度を有する酵素、より望ましくは、斯かる至適温度に加え、酸性域に至適pHを有する酵素を意味する。この発明のトレハロース遊離酵素とは、トレハロース遊離酵素としての作用を有し、中温域、望ましくは、45℃を越え且つ60℃未満の範囲に至適温度を有する酵素、より望ましくは、斯かる至適温度に加え、酸性域に至適pHを有する酵素を意味する。以上の如きこの発明の非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素はその出所・由来により限定されるものではない。

【0026】非還元性糖質生成酵素の活性は以下のようにして測定する。すなわち、基質として1.25% (w/v) マルトペンタオースを含む20mM酢酸緩衝液 (pH6.0) 4mlに、酵素液1mlを加え50℃で60分間保持して反応させた後、100℃で10分間加熱して反応を停止させ、その反応液を脱イオン水で正確に10倍希釈し、その希釈液の還元力をソモギー・ネルソン法で測定する。対照として、予め100℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。この発明においては、この測定方法を用いて、1分間に1μmolのマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を1単位と定義する。また、本明細書でいう当該酵素の至適温度は、この測定方法に準じて求められる。すなわち、反応温度を50℃を含む適宜の各種温度に設定して、一定量の当該酵素を用いて、この測定方法に準じて種々の温度条件下で反応させ、引き続き、この測定方法にしたがい各反応系における還元力の減少量を求める。そして、求められた還元力の減少量を相互に比較し、最大の値を示した反応系の反

応温度が当該酵素の至適温度と求められる。

【0027】トレハロース遊離酵素の活性は以下のようにして測定する。すなわち、基質として1.25% (w/v) マルトトリオシルトレハロース (別名、 $\alpha$ -マルトテトラオシル  $\alpha$ -D-グルコシド) を含む20mM 燐酸緩衝液 (pH 6.0) 4ml に、酵素液1ml を加え50℃で30分間保持して反応させた後、ソモギー銅液を加え反応を停止させ、還元力をソモギー・ネルソン法で測定する。対照として、予め100℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。この発明においては、この測定方法を用いて、1分間に1 $\mu$ molのグルコースに相当する還元力を増加させる酵素量を1単位と定義する。また、本明細書でいう当該酵素の至適温度は、この測定方法に準じて求められる。すなわち、反応温度を50℃を含む適宜の各種温度に設定して、一定量の当該酵素を用いて、この測定方法に準じて種々の温度条件下で反応させ、引き続き、この測定方法にしたがい各反応系における還元力の増加量を求める。そして、求められた還元力の増加量を相互に比較し、最大の値を示した反応系の反応温度が当該酵素の至適温度と求められる。

【0028】この発明の非還元性糖質生成酵素を、そのアミノ酸配列に基づいて説明すると、当該酵素は、全体としては配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を、部分アミノ酸配列としては、配列表における配列番号2乃至6に示すアミノ酸配列を含有する場合がある。この発明の非還元性糖質生成酵素には、以上のアミノ酸配列をそっくりそのまま含有する酵素に加えて、斯かるアミノ酸配列から選ばれるいずれかの配列の一部を含有するものであっても、それが非還元性糖質生成酵素としての作用を有し、且つ、上述の如き至適温度を有している限り包含される。斯かるアミノ酸配列の一部を含有する当該酵素のアミノ酸配列としては、斯かるアミノ酸配列において、この発明の非還元性糖質生成酵素としての性質の発現に関わる部分アミノ酸配列ないしはアミノ酸残基を保持しつつ、それ以外の部分の1箇所又は2箇所以上にアミノ酸の置換、付加及び/又は欠失を導入してなるアミノ酸配列を挙げることができる。ここでいうアミノ酸の置換を導入してなるアミノ酸配列としては、例えば、配列番号1に示すアミノ酸配列を構成する全アミノ酸の、望ましくは30%未満、より望ましくは20%未満のアミノ酸を、それぞれ性質や構造の類似する他のアミノ酸で置換してなるものが挙げられる。互いに性質や構造の類似するアミノ酸のグループとしては、例えば、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸、塩基性アミノ酸であるリジンとアルギニンとヒスチジン、アミド型アミノ酸であるアスパラギンとグルタミン、ヒドロキシアミノ酸であるセリンとトレオニン、分岐アミノ酸であるバリンとロイシンとイソロイシン、などが挙げられる。また、配列番号1乃至6に示すアミノ

酸配列から選ばれるいずれかの配列の一部を含有する当該酵素のアミノ酸配列の別の例としては、配列番号1のアミノ酸配列の蛋白質がとる立体構造と実質的に同等の立体構造をとり得る、配列番号1のアミノ酸配列にアミノ酸の置換、欠失及び/又は付加を導入してなるアミノ酸配列を挙げることができる。蛋白質の立体構造は、例えば、目的とするアミノ酸配列と関連するアミノ酸配列を有し立体構造が判明している蛋白質を慣用の蛋白質立体構造データベースから検索し、検索された立体構造を参照して、立体構造の視覚化のための慣用のソフトウェアを用いて予測することができる。以上のようなこの発明の非還元性糖質生成酵素のアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して、通常57%以上、望ましくは70%以上、より望ましくは80%以上の相同性を示す。

【0029】この発明の非還元性糖質生成酵素は、上述のように、特定の出所・由来に限定されるものではないが、当該酵素の具体例として、例えば、微生物由来のものを挙げることができる。斯かる微生物の具体例としてはアルスロバクター属に属する細菌、より具体的には、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERMBP-6450) 及びその変異株が挙げられる。当該変異株は、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERMBP-6450) を、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタン・スルフォネート、紫外線、トランスポゾンなどの慣用の変異源で常法にしたがい処理して生成する変異株を、中温域、通常は、40℃を越え且つ60℃未満の範囲に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素の産生能を指標として検索することにより得ることができる。アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERMBP-6450) 由来の当該酵素は、通常、配列表における配列番号1乃至6に示すアミノ酸配列を含有する。アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERMBP-6450) の変異株を含むアルスロバクター・スピーシーズS34 (FERMBP-6450) 以外の微生物由来の当該酵素は、通常、配列表における配列番号1乃至6のいずれかに示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する。当該酵素の別の具体例としては、非還元性糖質生成酵素としての作用を有し、中温域、通常は、40℃を越え且つ60℃未満の範囲に至適温度を有する組換え型蛋白質が挙げられる。斯かる組換え型蛋白質は、後述のように、この発明の非還元性糖質生成酵素をコードするDNAに通常の遺伝子工学的手法を適用して得ることができる。組換え型蛋白質としての当該酵素は、通常、配列表における配列番号1乃至6のいずれかに示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する。

【0030】以上の如きこの発明の非還元性糖質生成酵素は、下記の性質を有する場合がある。

(1) 作用



グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

(2) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (以下、「SDS-PAGE」と略記する。) により、約 75,000 ± 10,000 ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI 約 4.5 ± 0.5。

(4) 至適温度

pH 6.0、60 分間反応で、約 50℃ 付近。

(5) 至適 pH

50℃、60 分間反応で、pH 約 6.0 付近。

(6) 温度安定性

pH 7.0、60 分間保持で、約 55℃ 付近まで安定。

(7) pH 安定性

4℃、24 時間保持で、pH 約 5.0 乃至約 10.0 の範囲で安定。

この発明の非還元性糖質生成酵素は、後記に詳述する、この発明による当該酵素の製造方法によって所望量を得ることができる。

【0031】この発明は、この発明の非還元性糖質生成酵素をコードする DNA を提供するものでもあり、斯かる DNA は、組換え型蛋白質としての当該酵素の製造に極めて有用である。本発明による当該 DNA は、当該非還元性糖質生成酵素をコードする DNA 全般を包含するものであり、その出所・由来は問わない。斯かる DNA の具体例としては、例えば、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列又は斯かる塩基配列に相補的な塩基配列の一部又は全てを含有する DNA を挙げることができる。配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の全てを有する DNA は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列をコードする。配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の一部を含有する DNA とは、それにコードされる蛋白質における、この発明の非還元性糖質生成酵素としての性質の発現に関わるアミノ酸配列ないしはアミノ酸残基に対応する塩基を保持しつつ、それ以外の部分における 1 箇所又は 2 箇所以上に塩基の置換、付加及び／又は欠失を導入してなる塩基配列のいずれかを含有する DNA を意味する。本発明による当該 DNA には、それがコードするアミノ酸配列を変更することなく、遺伝子の縮重に基づいて塩基の 1 又は複数を他の塩基で置換した塩基配列を有する DNA も当然ながら包含される。また、この発明による当該 DNA には、当該非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列に、それ以外の塩基配列、例えば、開始コドン、終止コドン、シャイン・ダルガノ配列などのリボソーム結合配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、適宜の制限酵素による認識配列、プロモーターやエンハンサーなど遺伝子の発現を調節する塩基配

列、ターミネーター等、組換え型蛋白質の産生のために遺伝子工学分野で慣用される諸種の塩基配列から選ばれる 1 又は複数を連結してなる塩基配列を含有する DNA も包含される。例えば、配列表における配列番号 8 に示す塩基配列の一部又は全てはリボソーム結合配列として機能するので、斯る塩基配列をこの発明の非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列の上流に連結してなる DNA は、組換え型蛋白質としての当該酵素の製造に有用である。

10 【0032】本発明による、当該非還元性糖質生成酵素をコードする DNA は、上述のように、特定の出所・由来に限定されるものではない。当該 DNA は、当該非還元性糖質生成酵素のアミノ酸配列、例えば、配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードし得る塩基配列を含有する DNA とのハイブリダイゼーションに基づいて、諸種の給源からの DNA を検索して得ることができる。斯かる給源の具体例としては、例えば、アルスロバクター属に属する細菌、より望ましくは、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) 及びその変異株を含む当該非還元性糖質生成酵素の産生能を有する微生物が挙げられる。斯かる検索には、例えば、遺伝子ライブラリーのスクリーニング法や、PCR 法、さらにはこれらの変法など、斯界において DNA の検索ないしはクローン化に通常用いられる方法が適宜適用される。検索の結果、所期のハイブリダイゼーションが確認された DNA を常法にしたがって採取すれば、当該 DNA は得ることができる。斯くして得られる当該 DNA は、通常、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の一部又は全てを含有する。例えば、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) からは、通常、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の全てを含有する DNA が得られる。配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の一部を含有する DNA は、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) 以外の、本発明の非還元性糖質生成酵素の産生能を有する微生物を給源として得られる DNA を同様に検索することにより得ることができる。また、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の一部を含有する DNA は、慣用の突然変異導入法から選ばれる 1 又は複数の方法により、以上の如き DNA の 1 箇所又は 2 箇所以上に塩基の置換、付加及び／又は欠失を導入して得られる DNA より、この発明の非還元性糖質生成酵素としての性質を有する酵素をコードする DNA を選択することによっても得ることができる。また、当該 DNA は、当該非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列、例えば、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列に基づいて、通常の化学合成を適用することによっても得ることができる。い

40 ずれにしても、この発明による DNA は、一旦入手されれば、PCR 法や、自律複製可能なベクターを用いる方

50

法などを適用することにより、所望のレベルにまで容易に増幅することができる。

【0033】この発明による、当該非還元性糖質生成酵素をコードするDNAは、当該DNAが自律複製可能なベクターに挿入された、組換えDNAとしての形態のものをも包含する。斯かる組換えDNAは、上述のように一旦目的とするDNAが入手できれば、通常一般の遺伝子工学的技術により比較的容易に調製することができる。この発明で用いるベクターは適宜の宿主内で自律複製する性質を有するものであれば何を用いてもよく、斯かるベクターの具体例としては、例えば、大腸菌を宿主として用いる、pUC18、pBluescript I I SK (+)、pKK223-3及びλgt・λC等、枯草菌を宿主として用いる、pUB110、pTZ4、pC194、p11、φ1及びφ105等、2種類以上の微生物を宿主として用いる、pHY300PLK、pHV14、TRp7、YEp7及びpBS7等を挙げることができる。斯かるベクターにこの発明のDNAを挿入するには、斯界において慣用の方法が用いられる。具体的には、上述のようにして得られる当該DNAと自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断した後、当該DNA断片とベクター断片を連結する。DNAの切断に塩基配列に特異的に作用する制限酵素、とりわけ、KpnI、AccI、BamHI、BstXI、EcoRI、HindIII、NotI、PstI、SacI、SalI、SmaI、SpeI、XbaI、XhoIなどを用いれば、当該DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。連結には、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換えDNAは、適宜の宿主において無限に複製可能である。

【0034】この発明による、当該非還元性糖質生成酵素をコードするDNAは、さらに、当該DNAが適宜の宿主に導入された、形質転換体としての形態のものをも包含する。斯かる形質転換体は、通常、上述のようにして得られるDNAないしは組換えDNAを適宜の宿主に導入して形質転換することにより容易に得ることができる。宿主としては、当該組換えDNAにおけるベクターに応じて選択される、斯界において慣用される微生物や、植物、動物由来の細胞を用いることができる。宿主微生物としては、例えば、大腸菌、枯草菌、アルスロバクター属の微生物をはじめとする細菌の他、放線菌、酵母、真菌などはいずれも有利に用いることができる。宿主微生物にこの発明によるDNAを導入するには、例えば、公知のコンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。なお、この発明による形質転換体において、当該非還元性糖質生成酵素をコードするDNAは、宿主の染色体から独立した状態にあっても、斯かる染色体に組み込まれた状態にあってもよい。宿主の染色体に

組み込まれた当該DNAは、宿主内で安定して保持されるという特徴があり、組換え型蛋白質の製造に有利な場合がある。

【0035】この発明の非還元性糖質生成酵素は、当該非還元性糖質生成酵素の産生能を有する微生物を培養し、産生された非還元性糖質生成酵素を培養物から採取することを特徴とする、この発明による非還元性糖質生成酵素の製造方法によって所望量を得ることができる。斯かる製造方法で用いる微生物は、当該非還元性糖質生成酵素の産生能を有するものであれば何を用いてもよく、その種類は問わない。斯かる微生物の具体例としては、例えば、アルスロバクター属に属する細菌、より望ましくは、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) 及びその変異株をはじめとする微生物や、当該非還元性糖質生成酵素をコードするこの発明によるDNAを適宜の宿主微生物に導入して得られる形質転換体を挙げることができる。

【0036】この発明による非還元性糖質生成酵素の製造方法における培養で用いる栄養培地は、当該微生物が生育でき、当該非還元性糖質生成酵素を産生し得るものであればよく、特定の組成の培地に限定されるものではない。当該培地は、通常、炭素源及び窒素源を含有し、必要に応じて無機成分が添加される。炭素源としては、当該微生物が資化し得るものであればよく、例えば、デキストリン、澱粉、澱粉部分分解物、グルコースなどの糖質、糖蜜及び酵母エキス等の糖含有物のほか、グルコン酸やコハク酸などの有機酸はいずれも有用である。炭素源の濃度は、その種類に応じて適宜選択されるが、通常、30% (w/v) 以下、より望ましくは、15% (w/v) 以下の条件が適用される。窒素源は、通常、アンモニウム塩や硝酸塩などの無機窒素化合物の他、尿素や、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物から適宜選択される。無機成分としては、例えば、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などから適宜選ばれる塩類が必要に応じて用いられる。

【0037】この発明による当該非還元性糖質生成酵素の製造方法における培養条件は、使用する微生物に応じて、それぞれの微生物の生育に適した条件が適宜に選択される。例えば、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) などのアルスロバクター属に属する微生物を使用する場合、培養温度は通常、20乃至50℃、望ましくは、25乃至37℃、培養pHは通常pH4乃至10、望ましくは、pH5乃至9、培養時間は10乃至150時間から選ばれ、好気条件下で培養される。一方、当該非還元性糖質生成酵素をコードするDNAを宿主微生物に導入してなる形質転換体を使用する場合、宿主の微生物種やベクターの種類にもよる

が、培養温度は通常、20乃至65℃、培養pHは通常、pH2乃至9、培養時間は通常、1乃至6日間から選ばれ、好気条件下で培養される。斯くして得られる培養物は、通常、主としてその菌体画分に当該酵素を含有する。一方、枯草菌などを宿主として得た形質転換体を培養する場合には、形質転換に用いるベクターの種類によっては、斯かる培養物は、主としてその上清画分に当該酵素を含有する場合もある。以上のようにして得られる培養物における当該酵素の含量は、用いる微生物の種類や培養条件などにもよるが、通常、培養物1ml当たり

10 0.01乃至1.000単位である。  
【0038】以上のようにして得られる培養物から、この発明の非還元性糖質生成酵素を採取する。培養物からの当該酵素の採取の方法は問わないが、例えば、当該酵素活性が主として認められる菌体又は培養上清のいずれかの画分を分離して採取し、さらに必要に応じて、採取した画分を適宜の精製手段に供して、当該非還元性糖質生成酵素を含有する精製された画分を採取する。培養物における菌体と培養上清との分離には、通常の固液分離手段、例えば、遠心分離のほか、プレコートフィルターや平膜、中空糸膜などを用いる濾過などはいずれも有利に適用できる。斯くして分離される菌体含有画分及び培養上清から所望の画分を採取する。採取する画分が菌体含有画分である場合、斯かる菌体を破碎して菌体破碎物としたり、さらには、菌体破碎物からその可溶性画分を上記の固液分離手段によって、その可溶性画分としての菌体抽出液及び菌体不溶性画分に分離し、所望のいずれかの画分を採取することも随意である。菌体不溶性画分は、更に必要に応じて、常法により可溶化して用いることもできる。菌体の破碎には、通常の、超音波処理、界面活性剤処理、リゾチームやグルカナーゼなどの細胞壁破壊酵素による処理、機械的磨砕、機械的圧力の負荷などは、いずれも有利に適用できる。また、菌体の破碎には、培養物そのものを直接これらの菌体の破碎方法のいずれかで処理し、上述の固液分離手段のいずれかを適用して液体画分を採取して菌体抽出液を得ることも有利に実施できる。

【0039】以上のようにして得られる画分から当該非還元性糖質生成酵素をさらに精製するには、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動などの糖質関連酵素を精製するための斯界における慣用の方法が適用され、必要に応じてこれらは適宜組合せて適用される。斯様な方法によって分離される画分の中から、非還元性糖質生成酵素の活性測定に基づき、所期の活性を示した画分を回収すれば、所望のレベルにまで精製された当該酵素を採取することができる。例えば、下記に詳述する実施例に記載の方法によれば、当該

酵素は電気泳動的に均質な状態にまで精製することができる。以上のようにして、この発明の製造方法によってこの発明の非還元性糖質生成酵素は、培養物、培養上清画分、菌体含有画分、菌体破碎物、菌体抽出液、菌体不溶性画分とその可溶化物、部分精製酵素含有画分、精製酵素含有画分などとして得られる。当該画分は、さらにトレハロース遊離酵素を含有する場合がある。なお、以上のようにして得られるこの発明の非還元性糖質生成酵素は、常法にしたがい固定化して用いることも随意である。斯かる固定化の方法としては、例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが挙げられる。以上のようにして得られる当該非還元性糖質生成酵素は、いずれも、後述するこの発明の糖質の製造方法を含む各種糖質の製造において有利に用いることができる。とりわけ、当該非還元性糖質生成酵素は、中温域に至適温度を有す上、望ましくは、酸性域に至適pHを有しているの、後述するこの発明のトレハロース遊離酵素の他、酸性域に至適pHを有する澱粉枝切り酵素、中温域で良好な活性を示すシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼなどとの併用による糖質の製造に極めて有用である。

【0040】次に、この発明のトレハロース遊離酵素を、そのアミノ酸配列に基づいて説明すると、当該酵素は、全体としては配列表における配列番号9に示すアミノ酸配列を、部分アミノ酸配列としては、配列表における配列番号10乃至16に示すアミノ酸配列を含有する場合がある。この発明のトレハロース遊離酵素には、以上のアミノ酸配列をそっくりそのまま含有する酵素に加えて、斯かるアミノ酸配列から選ばれるいずれかの配列の一部を含有するものであっても、それがトレハロース遊離酵素としての作用を有し、且つ、上述の如き至適温度を有している限り包含される。斯かるアミノ酸配列の一部を含有する当該酵素の具体例としては、斯かるアミノ酸配列において、この発明のトレハロース遊離酵素としての性質の発現に関わるアミノ酸配列ないしはアミノ酸残基を保持しつつ、それ以外の部分の1箇所又は2箇所以上にアミノ酸の置換、付加及び／又は欠失を導入してなるアミノ酸配列のいずれかを含有する酵素を挙げることができる。ここでいうアミノ酸の置換を導入してなるアミノ酸配列としては、例えば、配列番号9に示すアミノ酸配列を構成する全アミノ酸の、望ましくは30%未満、より望ましくは20%未満のアミノ酸を、それぞれ性質や構造の類似する他のアミノ酸で置換してなるものが挙げられる。互いに性質や構造の類似するアミノ酸のグループとしては、例えば、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸、塩基性アミノ酸であるリジンとアルギニンとヒスチジン、アミド型アミノ酸であるアスパラギンとグルタミン、ヒドロキシアミノ酸であるセリンとトレオニン、分岐アミノ酸であるバリンとロイ

シンとイソロイシン、などが挙げられる。また、配列番号 9 乃至 16 に示すアミノ酸配列から選ばれるいずれかの配列の一部を含有する当該酵素のアミノ酸配列の別の例としては、配列番号 9 のアミノ酸配列の蛋白質がとる立体構造と実質的に同等の立体構造をとり得る、配列番号 9 のアミノ酸配列にアミノ酸の置換、欠失及び／又は付加を導入してなるアミノ酸配列を挙げることができる。蛋白質の立体構造は、例えば、目的とするアミノ酸配列と関連するアミノ酸配列を有し立体構造が判明している蛋白質を慣用の蛋白質立体構造データベースから検索し、検索された立体構造を参照して、立体構造の視覚化のための慣用のソフトウェアを用いて予測することができる。以上のようなこの発明のトレハロース遊離酵素のアミノ酸配列は、配列番号 9 に示すアミノ酸配列に対して、通常 60% 以上、望ましくは 70% 以上、より望ましくは 80% 以上の相同性を示す。

【0041】この発明のトレハロース遊離酵素は、上述のように、特定の出所・由来に限定されるものではないが、当該酵素の具体例として、例えば、微生物由来のものを挙げることができる。斯かる微生物の具体例としてはアルスロバクター属に属する細菌、より具体的には、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERMBP-6450) 及びその変異株が挙げられる。当該変異株は、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERMBP-6450) を、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタン・スルフォネート、紫外線、トランスポゾンなどの慣用の変異源で常法にしたがい処理して生成する変異株を、中温域、通常は、45℃を越え且つ 60℃未満の範囲に至適温度を有するトレハロース遊離酵素の産生能を指標として検索することにより得ることができる。アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERMBP-6450) 由来の当該酵素は、通常、配列表における配列番号 9 乃至 16 に示すアミノ酸配列を含有する。アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERMBP-6450) の変異株を含む、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERMBP-6450) 以外の微生物由来の当該酵素は、通常、配列表における配列番号 9 乃至 16 のいずれかに示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する。当該酵素の別の具体例としては、トレハロース遊離酵素としての作用を有し、中温域、通常は 45℃を越え且つ 60℃未満の範囲に至適温度を有する組換え型蛋白質が挙げられる。斯かる組換え型蛋白質は、後述のように、この発明のトレハロース遊離酵素をコードする DNA に慣用の遺伝子工学的手法を適用して得ることができる。組換え型蛋白質としての当該酵素は、通常、配列表における配列番号 9 乃至 16 のいずれかに示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する。

【0042】以上の如きこの発明のトレハロース遊離酵素は、下記の理化学的性質を有する場合がある。

#### (1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する。

#### (2) 分子量

SDS-PAGE により、約 62,000 ± 5,000 ダルトン。

#### (3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI 約 4.7 ± 0.5。

#### (4) 至適温度

pH 6.0、30 分間反応で、約 50℃乃至約 55℃付近。

#### (5) 至適 pH

50℃、30 分間反応で、pH 約 6.0 付近。

#### (6) 温度安定性

pH 7.0、60 分間保持で、約 50℃付近まで安定。

#### (7) pH 安定性

4℃、24 時間保持で、pH 約 4.5 乃至約 10.0 の範囲で安定。

この発明のトレハロース遊離酵素は、後記に詳述する、この発明による当該酵素の製造方法によって所望量を得ることができる。

【0043】この発明は、この発明のトレハロース遊離酵素をコードする DNA を提供するものでもあり、斯かる DNA は、組換え型蛋白質としての当該酵素の製造に極めて有用である。本発明による当該 DNA は、当該トレハロース遊離酵素をコードする DNA 全般を包含するものであり、その出所・由来は問わない。斯かる DNA の具体例としては、例えば、配列表における配列番号 17 に示す塩基配列又は斯かる塩基配列に相補的な塩基配列の一部又は全てを含有する DNA を挙げることができる。配列表における配列番号 17 に示す塩基配列の全てを有する DNA は、配列番号 9 に示すアミノ酸配列をコードする。配列表における配列番号 17 に示す塩基配列の一部を含有する DNA とは、それにコードされる蛋白質における、この発明のトレハロース遊離酵素としての性質の発現に関わるアミノ酸配列ないしはアミノ酸残基に対応する塩基を保持しつつ、それ以外の部分における 1 箇所又は 2 箇所以上に塩基の置換、付加及び／又は欠失を導入してなる塩基配列のいずれかを含有する DNA を意味する。本発明による当該 DNA には、それがコードするアミノ酸配列を変更することなく、遺伝子の縮重に基づいて塩基の 1 又は複数を他の塩基で置換した塩基配列を有する DNA も当然ながら包含される。また、この発明による当該 DNA には、当該トレハロース遊離酵素をコードする塩基配列に、それ以外の塩基配列、例えば、開始コドン、終止コドン、シャイン・ダルガノ配列などのリボソーム結合配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、適宜の制限酵素による認識配列、プロモ

ーターやエンハンサーなど遺伝子の発現を調節する塩基配列、ターミネーター等、組換え型蛋白質の産生のために遺伝子工学分野で慣用される諸種の塩基配列から選ばれる 1 又は複数を連結してなる塩基配列を含有する DNA も包含される。例えば、配列表における配列番号 8 に示す塩基配列の一部又は全てはリボソーム結合配列として機能するので、斯る塩基配列をこの発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列の上流に連結してなる DNA は、組換え型蛋白質としての当該酵素の製造に有用である。

【0044】本発明による、当該トレハロース遊離酵素をコードする DNA は、上述のように、特定の出所・由来に限定されるものではない。当該 DNA は、当該トレハロース遊離酵素のアミノ酸配列、例えば、配列表における配列番号 9 に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードし得る塩基配列を含有する DNA とのハイブリダイゼーションに基づいて、諸種の給源からの DNA を検索して得ることができる。斯かる給源の具体例としては、例えば、アルスロバクター属に属する細菌、より望ましくは、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) 及びその変異株を含む当該トレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物が挙げられる。斯かる検索には、例えば、遺伝子ライブラリーのスクリーニング法や、PCR 法、さらにはこれらの変法など、斯界において DNA の検索ないしはクローン化に通常用いられる方法が適宜適用される。検索の結果、所期のハイブリダイゼーションが確認された DNA を常法にしたがって採取すれば、当該 DNA は得ることができる。斯くして得られる当該 DNA は、通常、配列表における配列番号 17 に示す塩基配列の一部又は全てを含有する。例えば、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) からは、通常、配列表における配列番号 17 に示す塩基配列の全てを含有する DNA が得られる。配列表における配列番号 17 に示す塩基配列の一部を含有する DNA は、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) 以外の、本発明のトレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物を給源として得られる DNA を同様にして検索することにより得ることができる。また、配列表における配列番号 17 に示す塩基配列の一部を含有する DNA は、慣用の突然変異導入法から選ばれる 1 又は複数の方法により、以上の如き DNA の 1 箇所又は 2 箇所以上に塩基の置換、付加及び／又は欠失を導入して生成される DNA より、この発明のトレハロース遊離酵素としての性質を有する酵素をコードする DNA を選択することによっても得ることができる。また、当該 DNA は、当該トレハロース遊離酵素をコードする塩基配列、例えば、配列表における配列番号 17 に示す塩基配列に基づいて、通常の化学合成を適用することによっても得ることができる。いずれにしても、この発明による DNA は、一旦入

手されれば、PCR 法や、自律複製可能なベクターを用いる方法などを適用することにより、所望のレベルにまで容易に増幅することができる。

【0045】この発明による、当該トレハロース遊離酵素をコードする DNA は、当該 DNA が自律複製可能なベクターに挿入された、組換え DNA としての形態のものをも包含する。斯かる組換え DNA は、上述のように一旦目的とする DNA が入手できれば、通常一般の遺伝子工学的技術により比較的容易に調製することができる。

この発明で用いるベクターは適宜の宿主内で自律複製する性質を有するものであれば何を用いてもよく、斯かるベクターの具体例としては、例えば、大腸菌を宿主として用いる、pUC18、pBluescript I I SK (+)、pKK223-3 及び  $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ C 等、枯草菌を宿主として用いる、pUB110、pTZ4、pC194、 $\rho$ 11、 $\phi$ 1 及び  $\phi$ 105 等、2 種類以上の微生物を宿主として用いる、pHY300PLK、pHV14、TRp7、YEp7 及び pBS7 等を挙げることができる。斯かるベクターにこの発明の DNA を挿入するには、斯界において慣用の方法が用いられる。具体的には、上述のようにして得られる当該 DNA と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断した後、当該 DNA 断片とベクター断片を連結する。DNA の切断に塩基配列に特異的に作用する制限酵素、とりわけ、KpnI、AccI、BamHI、BstXI、EcoRI、HindIII、NotI、PstI、SacI、SalI、SmaI、SpeI、XbaI、XhoI などを用いれば、当該 DNA 断片とベクター断片を連結するのが容易となる。連結には、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外で DNA リガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換え DNA は、適宜の宿主において無限に複製可能である。

【0046】この発明による、当該トレハロース遊離酵素をコードする DNA は、さらに、当該 DNA が適宜の宿主に導入された、形質転換体としての形態のものをも包含する。斯かる形質転換体は、通常、上述のようにして得られる DNA ないしは組換え DNA を適宜の宿主に導入して形質転換することにより容易に得ることができる。宿主としては、当該組換え DNA におけるベクターに応じて選択される、斯界において慣用される微生物を用いることができる。斯かる宿主微生物としては、例えば、大腸菌、枯草菌、アルスロバクター属の微生物をはじめとする細菌の他、放線菌、酵母、真菌などはいずれも有利に用いることができる。斯かる宿主にこの発明による DNA を導入するには、例えば、公知のコンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。この発明による形質転換体において、当該トレハロース遊離酵素をコードする DNA は、宿主微生物の染色体と独立した状態にあっても、斯かる染色体に組み込まれた状態に

あってもよい。宿主微生物の染色体に組み込まれた当該DNAは、宿主内で安定して保持されるという特徴があり、組換え型蛋白質の製造に有利な場合がある。

【0047】なお、以上ならびに先述の、組換えDNA及び形質転換体を含むこの発明によるDNAを得るための個々の方法や、斯かるDNAを用いる組換え型蛋白質の産生の方法はいずれも斯界において慣用となっている。例えば、ジェイ・サムブルックら、『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版(1989年)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行には、所期のDNAの取得や、取得したDNAの物質生産への利用のための方法が種々詳述されている。また、例えば、特許第2576970号明細書には、目的とする遺伝子を欠損させた細菌を宿主として用いる形質転換DNAの安定化方法が、特開昭63-157987号公報には、枯草菌で効率的に所期のDNAを発現させるベクターが、特表平5-502162号公報には、細菌染色体への所期のDNAへの安定な組み込みの方法が、特表平8-506731号公報には澱粉分解酵素の遺伝子工学的手法を用いる効率的な産生方法が、特表平9-500543号公報や特表平10-500024号公報には組換え型蛋白質の効率的な産生のための真菌を用いる宿主-ベクター系がそれぞれ開示されている。この発明においては、以上の如き斯界における慣用の方法はいずれも有利に適用できる。

【0048】ところで、斯界においては、所望のDNAが上述のようにして得られている場合、斯かるDNAを適宜の動植物体に導入してなる、いわゆる、トランスジェニック動物やトランスジェニック植物を得ることは慣用となっている。この発明の非還元性糖質生成酵素ないしはトレハロース遊離酵素をコードするDNAにおける、適宜の宿主に導入された形態のDNAには、斯かるトランスジェニック動物ないしトランスジェニック植物も包含される。トランスジェニック動物を得るには、概略としては、先ず、当該酵素をコードするDNAを、必要に応じてプロモーターやエンハンサーなど所望の他のDNAとともに、宿主動物の種に応じて選択される適宜のベクターに組み込み、斯かる組換えDNAをマイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法や当該DNAを含有する組換えウイルスの感染などの方法により、宿主として用いる動物の受精卵や胚性幹細胞に導入する。宿主動物としては、マウス、ラット、ハムスターなど実験動物として汎用される齧歯類のほか、山羊、羊、ブタ、牛などの家畜として常用される哺乳動物も飼育の容易さの点で有用である。次に、このようにして得られる、当該DNAの導入された細胞を、斯かる細胞と同種の偽妊娠雌動物の卵管内又は子宮内に移植する。その後、自然分娩や帝王切開などにより生まれる新生児の中から、ハイブリダイゼーション法やPCR法などを適用して当該酵素をコードするDNAが導入されたトラン

スジェニック動物を選択すればよい。斯くしてトランスジェニック動物としての形態のこの発明のDNAは得ることができる。なお、トランスジェニック動物に関しては、例えば、村松正實、岡山博人、山本雅編集、『実験医学別冊 新 遺伝子工学ハンドブック』、1996年、羊土社発行、269乃至283頁に、その手法が詳述されている。一方、トランスジェニック植物を得るには、例えば、先ず、植物への感染性を有するアグロバクテリウム属微生物のプラスミドをベクターとして用いて、斯かるベクターに、当該酵素をコードするDNAを組み込み、得られる組換えDNAを植物体や植物のプロトプラストに導入したり、重金属の微粒子を当該酵素をコードする塩基配列を含むDNAでコートし、斯かる微粒子をパーティクルガンを用いて植物体や植物のプロトプラストに直接注入する。宿主植物としては種々のものを用いることができるが、通常、ジャガイモ、大豆、小麦、大麦、米、トウモロコシ、トマト、レタス、アルファルファ、リンゴ、桃、メロンなどの食用の植物が用いられる。斯くして得られる植物体ないしは植物のプロトプラストに、ハイブリダイゼーション法やPCR法を適用して所期のDNAを含むものを選択し、プロトプラストの場合にはそれを植物体として再生させれば、トランスジェニック植物としての形態のこの発明のDNAは得ることができる。なお、トランスジェニック植物に関しては、ジェーン・ケイ・セトロウ編集、『ジェネティック・エンジニアリング』、第16巻、1994年、プレナム・プレス発行、93乃至113頁に、その手法が種々概説されている。以上の如きトランスジェニック動物ないしはトランスジェニック植物の形態のこの発明のDNAは、この発明の非還元性糖質生成酵素及び/又はトレハロース遊離酵素の給源として、また、トレハロース又はトレハロース構造有する非還元性糖質を含有する食用の動植物として利用することができる。

【0049】この発明のトレハロース遊離酵素は、当該トレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物を栄養培地に培養し、産生されたトレハロース遊離酵素を培養物から採取することを特徴とする、この発明によるトレハロース遊離酵素の製造方法によって所望量を得ることができる。斯かる製造方法で用いる微生物は、当該トレハロース遊離酵素の産生能を有するものであればいずれでもよく、その種類は問わない。斯かる微生物の具体例としては、例えば、アルスロバクター属に属する細菌、より望ましくは、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)及びその変異株等の微生物や、当該トレハロース遊離酵素をコードするこの発明によるDNAを適宜の宿主微生物に導入して得られる形質転換体を挙げるることができる。

【0050】この発明によるトレハロース遊離酵素の製造方法で用いる栄養培地は、当該微生物が生育でき、当該トレハロース遊離酵素を産生し得るものであればい

れでもよく、特定の組成の培地に限定されるものではない。当該培地は、通常、炭素源及び窒素源を含有し、必要に応じて無機成分が添加される。炭素源としては、当該微生物が資化できるものであればよく、例えば、デキストリン、澱粉、澱粉部分分解物、グルコースなどの糖質、糖蜜及び酵母エキス等の糖含有物のほか、グルコン酸やコハク酸などの有機酸はいずれも有用である。炭素源の濃度は、その種類に応じて適宜選択されるが、通常、30% (w/v) 以下、より望ましくは、15% (w/v) 以下の条件が適用される。窒素源は、通常、アンモニウム塩や硝酸塩などの無機窒素化合物の他、尿素や、コーン・スティープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物から適宜選択される。無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などから適宜選ばれる塩類が必要に応じて用いられる。

【0051】この発明による当該トレハロース遊離酵素の製造方法における培養条件は、使用する微生物に応じて、それぞれの微生物の生育に適した条件が適宜に選択される。例えば、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) などのアルスロバクター属に属する微生物を使用する場合、培養温度は通常、20乃至50℃、望ましくは、25乃至37℃、培養pHは通常pH4乃至10、望ましくは、pH5乃至9、培養時間は10乃至150時間から選ばれ、好気条件下で培養される。一方、当該トレハロース遊離酵素をコードするDNAを宿主微生物に導入してなる形質転換体を使用する場合、宿主の微生物種やベクターの種類にもよるが、培養温度は通常、20乃至65℃、培養pHは通常、pH2乃至9、培養時間は通常、1乃至6日間から選ばれ、好気条件下で培養される。斯くして得られる培養物は、通常、主としてその菌体画分に当該酵素を含有する。一方、枯草菌などを宿主として得た形質転換体を培養する場合には、形質転換に用いるベクターの種類によっては、斯かる培養物は、主としてその上清画分に当該酵素を含有する場合もある。以上のようにして得られる培養物における当該酵素の含量は、用いる微生物の種類や培養条件などにもよるが、通常、培養物1ml当たり換算すると0.01乃至3,000単位である。

【0052】以上のようにして得られる培養物から、この発明のトレハロース遊離酵素を採取する。培養物からの当該酵素の採取の方法は問わないが、例えば、当該酵素活性が主として認められる菌体又は培養上清のいずれかの画分を分離して採取し、さらに必要に応じて、採取した画分を適宜の精製手段に供して、当該トレハロース遊離酵素を含有する精製された画分を採取する。培養物における菌体と培養上清との分離には、通常、固液分離手段、例えば、遠心分離のほか、プレコートフィルター

や平膜、中空糸膜などを用いる濾過などはいずれも有利に適用できる。斯くして分離される菌体含有画分及び培養上清から所望の画分を採取する。採取する画分が菌体含有画分である場合、斯かる菌体を破碎して菌体破碎物としたり、さらには、菌体破碎物からその可溶性画分を上記の固液分離手段によって、その可溶性画分としての菌体抽出液及び菌体不溶性画分に分離し、所望のいずれかの画分を採取することも随意である。菌体不溶性画分は、更に必要に応じて、常法により可溶化して用いることもできる。菌体の破碎には、通常の、超音波処理、界面活性剤処理、リゾチームやグルカナーゼなどの細胞壁破壊酵素による処理、機械的磨砕、機械的圧力の負荷などは、いずれも有利に適用できる。また、菌体の破碎には、培養物そのものを直接これらの菌体の破碎方法のいずれかで処理し、上述の固液分離手段のいずれかを適用して液体画分を採取して菌体抽出液を得ることも有利に実施できる。

【0053】以上のようにして得られる画分から当該トレハロース遊離酵素をさらに精製するには、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動などの糖質関連酵素を精製するための斯界における慣用の方法が適用され、必要に応じてこれらは適宜組合せて適用される。斯様な方法によって分離される画分の中から、トレハロース遊離酵素の活性測定に基づき、所期の活性を示した画分を回収すれば、所望のレベルにまで精製された当該酵素を採取することができる。例えば、下記に詳述する実施例に記載の方法によれば、当該酵素は電気泳動的に均質な状態にまで精製することができる。以上のようにして、この発明の製造方法によってこの発明のトレハロース遊離酵素は、培養物、培養上清画分、菌体含有画分、菌体破碎物、菌体抽出液、菌体不溶性画分とその可溶化物、部分精製酵素含有画分、精製酵素含有画分などとして得られる。当該画分は、さらに非還元性糖質生成酵素を含有する場合がある。なお、以上のようにして得られるこの発明のトレハロース遊離酵素は、常法にしたがい固定化して用いることも随意である。斯かる固定化の方法としては、例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが挙げられる。以上のようにして得られる当該トレハロース遊離酵素は、いずれも、後述するこの発明の糖質の製造方法を含む各種糖質の製造において有利に用いることができる。とりわけ、当該トレハロース遊離酵素は、中温域に至適温度を有す上、望ましくは、酸性域に至適pHを有しているの、後述するこの発明のトレハロース遊離酵素の他、酸性域に至適pHを有する澱粉枝切り酵素、中温域で良好な活性を示すシクロマルトデキストリン・グルカノトランス



フェラーゼなどの併用による糖質の製造に極めて有用である。

【0054】この発明は、以上に説明したこの発明の酵素を用いる、非還元性糖質を含む糖質の製造方法を提供するものでもある。この発明の糖質の製造方法は、当該非還元性糖質生成酵素及び／又は当該トレハロース遊離酵素を還元性澱粉部分分解物に作用させて非還元性糖質を生成させる工程と、該工程で生成した非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を採取する工程を含んでなる。斯かる糖質の製造方法においては、この発明以外の

10 非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素、さらには他の糖質関連酵素から選ばれる1又は複数を併用することを妨げない。斯かる糖質の製造方法で用いる還元性澱粉部分分解物は、その給源や調製方法によって限定されるものではない。この発明でいう非還元性糖質とは、トレハロースをはじめとするトレハロース構造有する非還元性糖質全般を意味する。

【0055】この発明の糖質の製造方法で使用する還元性澱粉部分分解物は、例えば、澱粉又は澱粉質を公知の方法で液化して得ることができる。斯かる澱粉は、とう

20 もろこし澱粉、米澱粉、小麦澱粉などの地上澱粉であっても、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、タピオカ澱粉などの地下澱粉であってもよい。斯かる澱粉の液化は、通常、澱粉を水に懸濁した澱粉乳、望ましくは、濃度10% (w/w) 以上、より望ましくは、約20乃至50% (w/w) の澱粉乳とし、これを機械的処理、酸処理又は酵素処理することにより行われる。液化の程度は比較的低いものが適しており、望ましくは、デキストロース・エキ

ブルナーゼなどの澱粉枝切り酵素、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼをはじめとする糖質関連酵素から選ばれる1又は複数の酵素とを作用させる。酵素を作用させるにあたっては、用いる酵素が作用し得る条件、通常、pH4乃至10、温度20乃至70℃、望ましくは、pH5乃至7、温度30乃至60℃から適宜選ばれる条件が採用される。とりわけ、40℃を越え且つ60℃未満若しくは45℃を越え60℃未満の中温域で、弱酸性乃至酸性の条件下で反応を行うと、より効率的に非還元製糖質を生成せしめることができる。還元性澱粉部分分解物にこれらの酵素を作用させる順序は問わず、いずれかの酵素を先に作用させ、他の酵素を後に作用させることも、用いる複数の酵素を同時に作用させることも随意である。

【0057】酵素の使用量は、酵素の作用条件・作用時間や、非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質の最終用途などに応じて適宜選ばれる。通常、還元性澱粉部分分解物の固形分1g当たり、非還元性糖質生成酵素及び

20 トレハロース遊離酵素の場合、いずれも、約0.01乃至約100単位、澱粉枝切り酵素の場合、約1乃至約10,000単位、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合、約0.05乃至約500単位から選ばれる。斯かる酵素作用により得られる反応液は、通常、非還元性糖質としてトレハロース、 $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース又は $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースを含有する。当該製造方法において、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素とともに澱粉枝切り酵素及びシクロマルトデキストリン・グルカノトラン

フェラーゼを併用する場合、トレハロース及びトレハロース構造有する非還元性糖質のうちの比較的低分子のものが多量に生成されるという特徴がある。

【0058】斯くして得られる反応液から非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を採取する。斯かる工程には、糖質の製造に慣用される方法が適宜適用される。具体的には、例えば、斯かる反応液を濾過、遠心分離などして不要物を除去した後、活性炭を用いる脱色ならびにH型・OH型イオン交換樹脂を用いる脱塩などにより精製し、さらに濃縮して、シラップ状製品として採取する。必要に応じてさらに精製し、高純度の非還元性糖質製品として採取することも随意である。さらなる精製には、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーを用いる分画、アルコール及びアセトンなどの有機溶媒を用いる分別沈殿、適度な分離性能を有する膜を用いる分離、さらには、酵母での発酵処理、アルカリ処理などにより残存している還元性糖質の分解除去などの方法を1種又は2



種以上組み合わせで適用することができる。とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーの採用が好適であり、例えば、特開昭 58-23799 号公報、特開昭 58-72598 号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去し、含量を向上させた非還元性糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【0059】このようにして得られる非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を、必要により、アミラーゼ、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどや、又は $\alpha$ -グルコシダーゼで分解し、甘味性、還元力などを調整したり、粘性を低下させたりすることも、また、同じ特許出願人による特開平 8-73482 号公報に開示された方法に準じて、水素添加して残存する還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。とりわけ、当該非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質に対して、グルコアミラーゼ又は $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させることにより容易にトレハロースを製造することができる。即ち、これらの非還元性又は低還元性糖質にグルコアミラーゼ又は $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させてトレハロースとグルコースとの混合溶液とし、これを、前述の精製方法、例えば、イオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取する。これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させて含水結晶又は無水結晶としてのトレハロースを得ることも有利に実施できる。

【0060】トレハロース含水結晶を製造するには、例えば、純度約 60% (w/w) 以上、固形分濃度約 65 乃至 90% (w/w) のトレハロース高含有液を助晶缶にとり、必要に応じて、0.1 乃至 20% (w/v) の種晶共存下で、温度 95℃ 以下、望ましくは 10 乃至 90℃ の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結晶を含有するマスキットを製造する。また、減圧濃縮しながら晶析させる連続晶析法を採用することも有利に実施できる。マスキットからトレハロース含水結晶又はこれを含む含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

【0061】分蜜方法の場合には、通常、マスキットをバスケット型遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜（母液）とを分離し、必要により、該結晶に少量の冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。噴霧乾燥方法の場合には、通常、固形分濃度 70 乃至 85% (w/w)、晶出率 20 乃至 60% 程度のマスキットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末

が溶解しない温度、例えば、60 乃至 100℃ の熱風で乾燥し、次いで 30 乃至 60℃ の温風で約 1 乃至 20 時間熟成すれば非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、ブロック粉碎方法の場合には、通常、水分 10 乃至 20% (w/w)、晶出率 10 乃至 60% 程度のマスキットを約 0.1 乃至 3 日間静置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉碎又は切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

【0062】また、無水結晶トレハロースを製造するには、上記のようにして得られる含水結晶トレハロースを、例えば、70℃ 乃至 160℃ の範囲の温度で常圧乾燥又は減圧乾燥、より望ましくは、80℃ 乃至 100℃ の範囲の温度で減圧乾燥するか、あるいは、水分 10% 未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶缶にとり、種晶共存下で 50 乃至 160℃、望ましくは 80 乃至 140℃ の範囲で攪拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的高温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉碎、流動造粒、噴霧乾燥などの方法で晶出、粉末化して製造される。

【0063】このようにして製造される非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質は、還元性が低く安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することもなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、還元力が低いにもかかわらず低粘度であり、平均グルコース重合度が低いもの場合には、良質で上品な甘味を有している。このようにして得られる糖質は、例えば、同じ特許出願人による特開平 8-66187 号公報、特開平 8-66188 号公報、特開平 8-73482 号公報、特開平 8-73506 号公報、特開平 8-73504 号公報、特開平 8-336363 号公報、特開平 9-9986 号公報、特開平 9-154493 号公報、特開平 9-252719 号公報、特開平 10-66540 号公報、特開平 10-168093 号公報、特願平 9-236441 号明細書、特願平 9-256219 号明細書、特願平 9-268202 明細書、特願平 9-274962 号明細書、特願平 9-320519 号明細書、特願平 9-338294 号明細書、特願平 10-55710 号明細書、特願平 10-67628 号明細書、特願平 10-134553 号明細書及び特願平 10-214375 号明細書などに開示されているように、食品分野、化粧品分野及び医薬品分野などにおいて有利に利用することができる。

【0064】次に、実施例によりこの発明をさらに具体的に説明する。

【0065】

【実施例 1】〈非還元性糖質生成酵素及び／又はトレハロース遊離酵素を産生する微生物〉中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素及び／又はトレハロース遊

離酵素を産生する微生物を土壌より広く検索したところ、兵庫県赤穂市の土壌から分離した微生物の1株が、目的とする酵素を産生し得るものであると認められた。そこで、この微生物を『微生物の分類と同定』、(長谷川武治編、学会出版センター、1985年)に準拠して同定試験に供した。同定試験の結果を以下にまとめた。

【0066】細胞形態に関する試験結果を以下に示す。

(1) 肉汁寒天培養、37℃

通常0.4乃至0.5×0.8乃至1.2μmの桿菌。単独。多形性あり。運動性なし。無孢子。非抗酸性。グラム陽性。

(2) EYG寒天培養、37℃

桿菌-球菌の生育サイクルを示す。

【0067】培養的性質に関する試験結果を以下に示す。

(1) 肉汁寒天平板培養、37℃

形状：円形 大きさは2日間で1乃至2mm

周縁：全縁

隆起：凸状

光沢：湿光

表面：平滑

色調：半透明、クリーム色

(2) 肉汁寒天斜面培養、37℃

生育度：良好

形状：糸状

(3) 酵母エキス・ペプトン寒天斜面培養、37℃

生育度：良好

形状：糸状

(4) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化しない。

【0068】生理学的性質に関する試験結果を以下に示す。

(1) メチルレッド試験：陰性

(2) VP試験：陽性

(3) インドールの生成：陰性

(4) 硫化水素の生成：陰性

(5) 澱粉の加水分解：陽性

(6) ゼラチンの液化：陰性

(7) クエン酸の利用：陽性

(8) 無機窒素源の利用：アンモニウム塩は利用しない。硝酸塩は利用する。

(9) 色素の生成：なし

(10) ウレアーゼ：陰性

(11) オキシダーゼ：陰性

(12)カタラーゼ：陽性

(13) 生育の範囲：pH4.5乃至8.0。温度20乃至50℃。最適温度30乃至45℃。

(14) 酸素に対する態度：好気性

(15) 炭素源の利用性：

Ｌ-アラビノース：利用しない

D-グルコース：利用する

D-フラクトース：利用しない

D-ガラクトース：利用しない

Ｌ-ラムノース：利用しない

D-キシロース：利用しない

D-マンノース：利用する

ラフィノース：利用しない

トレハロース：利用しない

スクロース：利用しない

マルトース：利用しない

ラクトース：利用しない

D-ズルシトール：利用しない

D-マンニトール：利用しない

グルコン酸：利用する

こはく酸：利用する

ニコチン酸：利用しない

Ｌ-マレイン酸：利用する

酢酸：利用する

乳酸：利用する

20 (16) 糖からの酸生成：

Ｌ-アラビノース：僅かに生成する

D-グルコース：僅かに生成する

D-フラクトース：生成しない

D-ガラクトース：僅かに生成する

Ｌ-ラムノース：僅かに生成する

D-キシロース：僅かに生成する

グリセロール：僅かに生成する

ラフィノース：生成しない

トレハロース：僅かに生成する

30 スクロース：僅かに生成する

マルトース：僅かに生成する

ラクトース：生成しない

(17) アミノ酸の利用：Ｌ-グルタミン酸ナトリウム、Ｌ-アスパラギン酸ナトリウム、Ｌ-ヒスチジン、Ｌ-アルギニンいずれも利用しない。

(18) アミノ酸の脱炭酸：Ｌ-リジン、Ｌ-オルニチン、Ｌ-アルギニンいずれも脱炭酸しない。

(19) DNase：陰性

(20) 細胞壁のN-アシル型：アセチル

(21) 細胞壁の主要ジアミノ酸：リジン

(22) DNAのG-C含量：71.2%

【0069】以上の菌学的性質を、『バーjeeズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー』、第2巻(1984年)を参考にして、公知の菌株とその異同を検討した。その結果、上記微生物は、アルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属する新規微生物であることが判明した。本発明者等は、上記微生物を新規微生物アルスロバクター・スピーシーズ(*Arthrobacter* sp.) S34と命名した。なお、アルスロバクター・スピーシーズS34は、

50

平成10年8月6日付けで、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省工業技術院生命工業技術研究所、特許微生物寄託センターに、微生物受託番号FERM BP-6450を付して受託された。

【0070】引き続き、上記微生物アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) と、米国の微生物寄託機関『アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC)』に寄託されている、アルスロバクター属に属する微生物のタイプ株とのDNAの相同性を、『バージーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー』、第1巻(1984年)に記載のDNA-DNAハイブリダイゼーション法に準じて調べた。すなわち、先ず、後記表1に示す12種のタイプ株をそれぞれ常法にしたがって培養し、培養物から菌体を採取した。また、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) を後記実施例2-1における種培養の方法で培養し、培養物から菌体を採取した。常法にしたがって、それぞれの菌体からDNAを採取し、その2μgずつを制限酵素Pst Iで消化した。これら消化物をアマシャム製ナイロン膜『Hybond-N+』上に個々にスポットした後、常法にしたがい、アルカリ処理の後、中和、乾燥させて、DNAを該ナイロン膜上に固定した。続いて、先に得た、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) 由来のDNAを1μgとり、これ

を、制限酵素Pst Iで消化した。該消化物を、アマシャム製[α-<sup>32</sup>P] dCTPとファルマシア製DNA標識キット『レディー・トゥー・ゴー、DNAラベリング・キット』とを用いて放射性同位元素で標識し、プローブを得た。このプローブと、先に準備した、DNAを固定したナイロン膜とを、20mlのアマシャム製ハイブリダイゼーション用緩衝液『ラビッド・ハイブリダイゼーション・バッファー』中で、65℃で振盪しつつ、2時間ハイブリダイゼーションに供した。ハイブリダイゼーション後のナイロン膜を常法にしたがって洗浄し、乾燥させた後、常法にしたがいオートラジオグラフィーに供した。オートラジオグラフィーで認められたハイブリダイゼーションのシグナルを、ファルマシア製画像解析システム『イメージ・マスター』を用いて解析し、それぞれのシグナルの強度を数値化した。得られた数値に基づいて、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) 由来のDNAのスポットにおけるシグナルの強度を100とした場合の、タイプ株由来のDNAのスポットにおけるシグナルの相対強度(%)を算出し、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) とそれぞれのタイプ株とのDNAの相同性を示す指標とした。結果を表1に示す。

【0071】

【表1】

微生物株名	ハイブリダイゼーションのシグナル の相対強度 (%)
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i> (ATCC 13752)	42.0
<i>Arthrobacter aureus</i> (ATCC 13344)	12.4
<i>Arthrobacter citreus</i> (ATCC 11624)	36.2
<i>Arthrobacter crystallipes</i> (ATCC 15481)	31.6
<i>Arthrobacter globiformis</i> (ATCC 8010)	55.1
<i>Arthrobacter nicotianae</i> (ATCC 15236)	18.8
<i>Arthrobacter oxydans</i> (ATCC 14358)	28.3
<i>Arthrobacter pascens</i> (ATCC 13346)	24.6
<i>Arthrobacter protophormiae</i> (ATCC 19271)	29.3
<i>Arthrobacter ramosus</i> (ATCC 13727)	98.6
<i>Arthrobacter ureafaciens</i> (ATCC 7562)	42.3
<i>Arthrobacter viscous</i> (ATCC 19584)	0.0
<i>Arthrobacter</i> sp. S34 (FERM BP-6450)	100

【0072】表1に示すように、ハイブリダイゼーションのシグナルの相対強度(%)は、アルスロバクター・ラモサス (*Arthrobacter ramosus*) のタイプ株 (ATCC 13727) 由来のDNAのスポットにおいて98.6%という高値を示した。このことから、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) は、本実施例で用いた12種のタイプ株のうちでは、アルスロバクター・ラモサ

ス (ATCC 13727) と最も高いDNAの相同性を有していることが判明した。以上実施例1に示した結果は、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) がアルスロバクター・ラモサス (ATCC 13727) と近縁の新規微生物であることを示している。

【0073】

【実施例2】〈非還元性糖質生成酵素〉

【0074】

【実施例 2-1】〈酵素の産生〉1.0% (w/v) デキストリン (松谷化学工業株式会社製、商品名『パインデックス#4』)、0.5% (w/v) ペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス0.1、0.1% (w/v) 燐酸一ナトリウム0.1、0.06% (w/v) 燐酸二カリウム、0.05% (w/v) 硫酸マグネシウム及び水からなる培地を pH 7.0 に調整した。500ml 容三角フラスコにこの培地を約 100ml ずつ入れ、オートクレーブで 120℃ で 20 分間滅菌し、冷却して、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) を接種し、温度 37℃、260rpm の攪拌条件下で 48 時間培養したものを種培養物とした。

【0075】容量 30l のファーマンターに、0.05% (w/v) 消泡剤 (信越化学工業株式会社製、商品名『KM-75』) を含むこと以外は種培養の場合と同組成の培地約 20l を入れて殺菌、冷却して温度 37℃ とした後、種培養物を培地に対して 1% (v/v) の割合で接種し、温度 37℃、pH 5.5 乃至 7.5 に保ちつつ、約 72 時間通気攪拌培養した。

【0076】得られた培養物の一部を採り、遠心分離して菌体と上清液とに分離した。この菌体を超音波で破碎し遠心分離して上清を回収して菌体抽出液を得た。培養上清と菌体抽出液それぞれの非還元性糖質生成酵素活性を測定したところ、培養上清には当該酵素活性が僅かであったのに対して、菌体抽出液には当該酵素活性が培養物 1ml 当たり換算して約 0.1 単位認められた。

【0077】

【実施例 2-2】〈酵素の精製〉実施例 2-1 の方法にしたがって得た培養物約 80l を、8,000rpm で 30 分間遠心分離することにより、湿重量で約 800g の菌体を得た。その菌体を 2l の 10M 燐酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し超音波ホモジナイザー (株式会社エスエムテ製、『モデル UH-600』) で処理した。処理液を、10,000rpm で 30 分間遠心分離し、その上清約 2l を回収した。この上清液に飽和度 0.7 になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、24 時間放置した後、10,000rpm で 30 分間遠心分離し、硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を 10mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させた後、同じ緩衝液に対して 48 時間透析し、10,000rpm で 30 分間遠心分離して不溶物を除去した。この透析内液約 1l を、約 1.3l の陰イオン交換樹脂 (三菱化学株式会社

製、商品名『セパビーズ FPD-DA13 ゲル』) を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。溶出は、通液に伴い 0M から 0.6M まで直線的に濃度が上昇する食塩を含む 10mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分の非還元性糖質生成酵素活性を測定した。その結果、約 0.2M の食塩を含む緩衝液でカラムから溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。

10 【0078】合一した溶液に硫酸を濃度 1M になるように加え 4℃ で 12 時間放置した後、10,000rpm で 30 分間遠心分離して上清を回収した。回収した上清を疎水性ゲル (東ソー株式会社製、商品名『ブチルトヨパール 650M ゲル』) を用いる疎水性カラムクロマトグラフィーに供した。ゲル量は約 300ml、ゲルは使用に先立って、1M 硫酸を含む 10mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した。溶出は、通液に伴い 1M から 0M まで直線的に濃度が下降する硫酸を含む 10mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分の非還元性糖質生成酵素活性を測定した。その結果、約 0.75M の硫酸で溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。

20 【0079】合一した溶液を 10mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、その透析内液を 10,000rpm で 30 分間遠心分離した。この上清を回収し、約 40ml の陰イオン交換樹脂 (東ソー株式会社製、商品名『DEAE-トヨパール 650S ゲル』) を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。溶出は、通液に伴い 0M から 0.2M まで直線的に濃度が上昇する食塩水溶液で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分の非還元性糖質生成酵素活性を測定した。その結果、約 0.15M 食塩で溶出された画分に顕著な当該酵素活性の認められ、これらの画分を合一した。合一した液を、引き続き、約 380ml の『ウルトロゲル AcA44 ゲル』 (フランス、セブラコル社製) を用いるゲル濾過クロマトグラフィーに供し、顕著な当該酵素活性の認められた画分を回収した。以上の、精製の各工程における非還元性糖質生成酵素の酵素活性量、比活性、

40 収率を表 2 に示す。

【0080】

【表 2】

工 程	非還元性糖質生成酵素 の活性量 (単位)	比 活 性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
菌体の抽出液	8,000	—	100
硫酸塩析後の透析内液	7,500	0.2	94
セパビーズカラム溶出液	5,200	0.7	65
疎水カラム溶出液	2,600	6.3	33
トヨパールカラム溶出液	910	67.4	11
ゲル濾過溶出液	59.0	168	0.7

【0081】上記のゲル濾過クロマトグラフィーで溶出され回収した溶液を、常法にしたがい、7.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いる電気泳動法に供したところ、単一の蛋白質バンドが確認された。この結果は、上記で得た、ゲル濾過クロマトグラフィーからの溶出物が、電気泳動的に均質な状態にまで精製された、非還元性糖質生成酵素の精製標品であることを意味している。

【0082】

【実施例2-3】〈酵素の性質〉

【0083】

【実施例2-3(a)】〈作用〉基質として、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、またはマルトヘプタオースの20%水溶液を調製し、それぞれ

に実施例2-2の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を基質固形分1g当たり2単位の割合で加え、50℃、pH6.0で48時間反応させた。反応産物を脱塩した後、『MCIゲル CK04SSカラム』（三菱化学株式会社製）2本を直列につないだカラムを用いる高速液体クロマトグラフィー（以下、「HPLC」という。）で分析し、各反応産物中の糖質の組成比を求めた。HPLCにおいて、カラムはカラムオープン『CO-8020』（東ソー株式会社製造）を用いて85℃に保持し、移動相として水を流速0.4ml/分で通液し、溶出物を示差屈折計『RI-8020』（東ソー株式会社製造）で分析した。結果を表3に示す。

【0084】

【表3】

基 質	反 応 産 物	溶出時間 (分)	組成比 (%)
グルコース	グルコース	57.2	100.0
マルトース	マルトース	50.8	100.0
マルトトリオース	グルコシルトレハロース	43.2	36.2
	マルトトリオース	46.2	63.8
マルトテトラオース	マルトシルトレハロース	38.9	87.2
	マルトテトラオース	42.3	12.8
マルトペンタオース	マルトトリオシルトレハロース	35.4	93.0
	マルトペンタオース	38.4	7.0
マルトヘキサオース	マルトテトラオシルトレハロース	32.7	93.8
	マルトヘキサオース	35.2	6.2
マルトヘプタオース	マルトペンタオシルトレハロース	30.2	94.2
	マルトヘプタオース	32.4	5.8

【0085】表3の結果から明らかなように、それぞれの反応産物は、残存する基質と新たに生成した非還元性糖質α-グルコシルトレハロース、α-マルトシルトレハロース、α-マルトトリオシルトレハロース、α-マルトテトラオシルトレハロース又はα-マルトペンタオシルトレハロース（表3においては、それぞれ、グルコ

シルトレハロース、マルトシルトレハロース、マルトトリオシルトレハロース、マルトテトラオシルトレハロース又はマルトペンタオシルトレハロースと表示した。）とからなり、それ以外の糖質はほとんど検出されなかった。各反応産物における非還元性糖質の組成比をその生成率として評価すると、グルコース重合度3のα-グル

コシルトレハロースは比較的低いものの、グルコース重合度 4 以上の  $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースはいずれも約 85% 以上という高い生成率であることが判明した。なお、グルコース及びマルトースからの非還元性糖質の生成は確認されなかった。

#### 【0086】

【実施例 2-3 (b)】〈分子量〉実施例 2-2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を、分子量マーカー（日本バイオ・ラド・ラボラトリーズ株式会社）と並行して、10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いる、通常の SDS-PAGE に供した。泳動後、分子量マーカーの泳動位置と比較した結果、当該酵素の分子量は約 75,000  $\pm$  10,000 ダルトンであった。

#### 【0087】

【実施例 2-3 (c)】〈等電点〉実施例 2-2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を、両性電解質『アンフォライン』（スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製）を 2% (w/v) の濃度で含有するポリアクリルアミドゲルを用いる等電点電気泳動法に供した。泳動後、ゲルの pH を測定した結果、当該酵素の等電点は約 4.5  $\pm$  0.5 であった。

#### 【0088】

【実施例 2-3 (d)】〈至適温度及び至適 pH〉実施例 2-2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を用いて、当該酵素活性に対する温度の影響及び pH の影響を調べた。温度の影響を調べる際には、適宜の各温度で反応させたこと以外は活性測定法にしたがって操作した。pH の影響を調べる際には、適宜の 20 mM 緩衝液を用いて適宜の各 pH 条件下で反応させたこと以外は活性測定法にしたがって操作した。それぞれの操作において、各反応系に認められた基質の還元力の減少量の相対値 (%) を算出し、相対酵素活性 (%) とした。結果を図 1 (温度の影響) 及び図 2 (pH の影響) に示す。図 1 で横軸は反応温度を、図 2 で横軸は反応 pH をそれぞれ示す。図 1 に示されるように、当該酵素の至適温度は、pH 6.0、60 分間反応で、約 50℃ 付近であった。図 2 に示されるように、当該酵素の至適 pH は、50℃、60 分間反応で、pH 約 6.0 付近であった。

#### 【0089】

【実施例 2-3 (e)】〈温度安定性及び pH 安定性〉実施例 2-2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を用いて、当該酵素の温度安定性及び pH 安定性を調べた。温度安定性は、当該酵素の精製標品を 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈し、適宜の各温度に 60 分間保持し、水冷した後、希釈液に残存する酵素活性を活性測定法にしたがい調べた。pH 安定性は、当該酵素の精製標品を適宜の各 pH の 50 mM 緩衝液で希釈

し、4℃で24時間保持した後、pHを6に調整し、希釈液に残存する酵素活性を活性測定法に従って調べた。結果を図3 (温度安定性) 及び図4 (pH安定性) に示す。図3で横軸は酵素の保持温度を、図4で横軸は酵素の保持 pH をそれぞれ示す。図3に示されるように、当該酵素は約 55℃ 付近まで安定であった。図4に示されるように、当該酵素は、pH 約 5.0 乃至約 10.0 の範囲で安定であった。

【0090】以上の結果は、実施例 2-2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素が、中温域に至適温度を有することの発明の非還元性糖質生成酵素であることを示している。

#### 【0091】

【実施例 2-4】〈部分アミノ酸配列〉実施例 2-2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品の一部を蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約 80  $\mu$ g を N 末端アミノ酸配列分析用の試料とした。N 末端アミノ酸配列は、『プロテインシーケンサー モデル 473A』（米国、アプライドバイオシステムズ社製造）を用い、N 末端から 20 残基まで分析した。得られた配列は、配列表における配列番号 4 に示すアミノ酸配列であった。

【0092】実施例 2-2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品の一部を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して透析した後、限外濾過膜（東ソー株式会社製、商品名『ウルトラセント-30』）を用い、常法にしたがい操作して、濃度約 1 mg/ml にまで濃縮した。この濃縮液 (0.2 ml) に 10  $\mu$ g のトリプシン試薬（和光純薬株式会社販売、商品名『TPCK-トリプシン』）を加え、30℃、22 時間反応させて当該酵素を消化し、ペプチドを生成させた。反応産物を、『マイクロボンドスフェア C18 カラム』（直径 3.9 mm  $\times$  長さ 150 mm、ウォーターズ社製）を用いる逆相 HPLC に供し、ペプチドを分離した。温度は室温で行った。溶出は、通液に伴い 60 分間で 24% (v/v) から 48% (v/v) まで直線的に濃度が上昇するアセトニトリルを含む 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液で、流速 0.9 ml/分で行った。カラムから溶出されたペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 2 個のペプチド、『S5』（保持時間約 23 分）及び『S8』（保持時間約 30 分）を分取し、それぞれを真空乾燥した後、50  $\mu$ l の 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む 50% (v/v) アセトニトリル水溶液に溶解した。これらのペプチド溶液をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 20 残基までアミノ酸配列を分析した。ペプチド『S5』からは、配列表における配列番号 5 に示すアミノ酸配列が、またペプチド『S8』からは、配列表における配列番号 6 に示すアミノ酸配列が得られた。

#### 【0093】

【実施例 3】〈非還元性糖質生成酵素をコードする DNA〉

【0094】

【実施例 3-1】〈遺伝子ライブラリーの作製と検索〉  
培養温度を 27℃ とし、培養時間を 24 時間としたこと  
以外は実施例 2-1 と同様にして、アルスロバクター・  
スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) を培  
養した。遠心分離により培養物から菌体を分離し、適量  
のトリス-EDTA-食塩緩衝液 (以下、「TES 緩衝  
液」いう。) (pH 8.0) に浮遊させ、リゾチームを  
当該菌体浮遊液の体積に対し 0.05% (w/v) の割  
合で加えた後、37℃ で 30 分間インキュベートした。  
この処理物を -80℃ で 1 時間保持して凍結させた後、  
ここに、予め TES 緩衝液 (pH 9.0) を加えて 60  
℃ に加温しておいた TES 緩衝液/フェノール混液を加  
えて十分に攪拌し、さらに氷冷後遠心分離して形成され  
た上層を採取した。この上層に、2 倍容の冷エタノール  
を加えて生成した沈澱を採取し、SSC 緩衝液 (pH  
7.1) の適量に溶解後、7.5 μg のリボヌクレアー  
ゼ及び 1.25 μg のプロテアーゼを加え、37℃ で 1 時  
間インキュベートした。ここに、クロロホルム/イソア  
ミルアルコール混液を加えて攪拌後、静置して形成され  
る上層を採取し、この上層に冷エタノールを加えて生成  
した沈澱を採取した。沈澱を冷 70% (v/v) エタノ  
ールで濯ぎ真空乾燥して、DNA を得た。得られた DN  
A は、濃度約 1 mg/ml となるように SSC 緩衝液  
(pH 7.1) に溶解し、-80℃ で凍結した。

【0095】上記で得た DNA 溶液を 50 μl とり、こ  
こに制限酵素 KpnI を約 50 単位加え、37℃ で 1 時  
間インキュベートして DNA を消化した。消化した DN  
A の 3 μg と、予め制限酵素 KpnI で消化しておいた  
ストラタジーン・クローニング・システムズ製プラスミ  
ドベクター『pBluescript II SK  
(+)』0.3 μg とを、宝酒造製『DNA ライゲシ  
ョン・キット』を用いて、添付の説明書にしたがって操  
作して連結した。通常のコンピテントセル法にしたがっ  
て、この連結産物でストラタジーン・クローニング・シ  
ステムズ製大腸菌『Epicurian Coli XL1-Blue』株 100 μl を形質転換して遺伝子ラ  
イブラリーを作製した。

【0096】作製した遺伝子ライブラリーを、常法によ  
り調製した、10 g/l トリプトン、5 g/l 酵母  
エキス、5 g/l 塩化ナトリウム、75 mg/l アン  
ピシリンナトリウム塩及び 50 mg/l 5-ブプロモ  
-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシドを含  
む寒天平板培地 (pH 7.0) に植菌し、37℃ で 18  
時間培養後、培地上に形成された白色のコロニー約 5,  
000 個を、常法にしたがって、アマシャム製ナイロン  
膜『Hybond-N+』上に固定した。別途、実施例  
2-4 の方法で明らかにした、配列表における配列番号

5 に示すアミノ酸配列における第 1 乃至 8 番目までのア  
ミノ酸配列に基づき、配列表における配列番号 18 に示  
す塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、常法に  
したがって [γ-<sup>32</sup>P] ATP 及び T4 ポリヌクレオチド  
キナーゼを用いて同位体標識してプローブを得た。この  
プローブを用いて、先に得たナイロン膜上に固定された  
コロニーを、通常のコロニー・ハイブリダイゼーション  
法に従って検索した。ハイブリダイゼーションは、適量  
のプローブを添加したハイブリダイゼーション液 (6 ×  
SSC、5 × デンハルト液及び 100 mg/l 変性サケ  
精子 DNA を含む) 中で、65℃ で 16 時間実施した。  
ハイブリダイゼーションを終えた上記ナイロン膜は、6  
× SSC で 65℃ で 30 分間洗浄した後、0.1% (w  
/v) SDS を含む 2 × SSC で 65℃ で 2 時間さらに  
洗浄した。洗浄後のナイロン膜を常法にしたがってオート  
ラジオグラフィーに供して認められたシグナルに基づ  
き、プローブと顕著なハイブリダイゼーションを示した  
コロニーを選択した。選択した形質転換体を『GY1』  
と命名した。

【0097】

【実施例 3-2】〈塩基配列の解読〉この形質転換体  
『GY1』を常法にしたがって、100 μg/ml アン  
ピシリンナトリウム塩を含む L-プロス培地 (pH 7.  
0) に植菌し、37℃ で 24 時間振盪培養した。培養終  
了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常  
のアルカリ-SDS 法により組換え DNA を抽出した。当  
該組換え DNA を『pGY1』と命名した。組換え DN  
A『pGY1』を、上記プローブを用いて通常のサザン  
分析法により分析し、分析結果に基づき制限酵素地図を  
作成した。作成した制限酵素地図を図 5 に示す。図 5 に  
示すように、組換え DNA『pGY1』は、図中太線で  
示されるアルスロバクター・スピーシーズ S34 (FE  
RM BP-6450) 由来の約 5,500 塩基対から  
なる塩基配列を含有し、そして、斯かる組換え DNA  
は、制限酵素 EcoRI による 2 箇所の認識部位の間の  
約 4,000 塩基対からなる領域に、図中太線の領域内  
の黒色矢印で示すように、当該非還元性糖質生成酵素を  
コードする塩基配列を含有することが判明した。そこ  
で、組換え DNA『pGY1』を制限酵素 EcoRI で  
完全に消化した後、通常のアガロースゲル電気泳動法を  
用いて、約 4,000 塩基対の DNA 断片を分離精製し  
た。この DNA 断片と、予め制限酵素 EcoRI で消化  
しておいたストラタジーン・クローニング・システムズ  
製プラスミドベクター『pBluescript II  
SK (+)』とを、通常のライゲーション法で連結し  
た。引き続き常法にしたがって、連結産物でストラタジ  
ーン・クローニング・システムズ製大腸菌『XL1-B  
lue』株を形質転換した。このようにして得られた形  
質転換体より常法にしたがって組換え DNA を抽出し、上  
記の約 4,000 塩基対の DNA 断片を含有することを

常法にしたがって確認し、『pGY2』と命名した。また、ここで得た、組換えDNA『pGY2』が導入されてなる形質転換体を『GY2』と命名した。

【0098】組換えDNA『pGY2』の塩基配列を、通常のジデオキシ法により分析したところ、当該組換えDNAは、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) に由来する、配列表における配列番号19に示す、3252塩基対からなる塩基配列を含有していた。この塩基配列は、配列番号19に併記したアミノ酸配列をコードし得るものであった。このアミノ酸配列と、実施例2-4の方法で確認された本発明の非還元性糖質生成酵素の部分アミノ酸配列である、配列表における配列番号4乃至6に示すアミノ酸配列とを比較した。その結果、配列表における配列番号4、5及び6に示すアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号19に併記したアミノ酸配列における第2乃至21番目、619乃至638番目及び第98乃至117番目のアミノ酸配列と完全に一致した。以上のことは、実施例2で得た本発明の非還元性糖質生成酵素が、配列表における配列番号19に併記したアミノ酸配列における第2乃至757番目のアミノ酸からなる配列、すなわち、配列番号1に示すアミノ酸配列を有することを示している。また、以上のことは、当該酵素はアルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) においては、配列表における配列番号19に示す塩基配列における第746乃至3013番目の塩基からなる配列、すなわち、配列番号7に示す塩基配列によりコードされていることをも示している。以上に示した組換えDNA『pGY2』の構造は図6にまとめている。

【0099】実施例2の方法で得られるこの発明の非還

元性糖質生成酵素の、上記で明らかにしたアミノ酸配列と、非還元性糖質生成酵素としての作用を有する公知の他の酵素のアミノ酸配列とを、ディー・ジェイ・リップマンら、『サイエンス』、227巻、1435乃至1441頁(1985年)に記載の方法にしたがって、市販のソフトウェア(商品名『ジェネティクス-マック (GENETYX-MAC)、バージョン8』、ソフトウェア開発株式会社販売)を用いて比較し、それぞれ相同性(%)を求めた。公知の酵素として、特開平7-322883号公報に開示されたアルスロバクター・スピーシーズ (*Arthrobacter* sp.) Q36由来のもの、特開平7-322883号公報に開示されたりゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) M-11由来のもの、特開平8-84586号公報に開示されたスルフォロバス・アシドカルダリウス (*Sulfolobus acidocaldarius*) ATCC33909由来のもの及び、再公表特許WO95/34642号公報に開示されたスルフォロバス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) KM1由来のものを用いた。以上の公知の酵素は上記公報に記載のとおり、いずれも中温域以外に至適温度を有するものである。なお、以上の公知の酵素のアミノ酸配列は、米国国立予防衛生研究所作成のDNAデータベース『ジェンバンク (GenBank)』から、それぞれのアクセシオン番号『D63343』、『D64128』、『D78001』及び、『D83245』により入手することもできる。求められた相同性を表4に示す。

【0100】

【表4】

アミノ酸配列(*)の比較の対象とした酵素の由来	アミノ酸配列の相同性
<i>Rhizobium</i> sp. M-11 (D78001)	56.9%
<i>Arthrobacter</i> sp. Q36 (D68343)	56.6%
<i>Sulfolobus solfataricus</i> KM1 (D64128)	33.2%
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ATCC 33909 (D83245)	31.4%

\*: 括弧内には、データベース「ジェンバンク」におけるそれぞれのアクセシオン番号を示した。

【0101】表4に示すように、実施例2によるこの発明の非還元性糖質生成酵素は、中温域以外に至適温度を有する公知の酵素のうちではリゾビウム・スピーシーズM-11由来の酵素と最も高い56.9%というアミノ酸配列の相同性を示した。この結果は、この発明の非還元性糖質生成酵素が、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して57%以上の相同性を有するアミノ酸配列を通常は含有することを意味している。また、アミノ酸配列の比較結果から、実施例2による当該酵素と上記の4種類の公知の酵素は、配列表における配列番号2及び3に示すアミノ酸配列を共通して含有していることが判明した。実施例2による当該酵素は、配列表における配列番

号1のアミノ酸配列における第84乃至89番目及び第277乃至282番目のアミノ酸からなる部分に見られるとおり、配列番号2及び3のアミノ酸配列を部分アミノ酸配列として含有している。上記で比較の対象とした4種類の酵素も、いずれも、それぞれ対応する部分にこれらの部分アミノ酸配列を含有している。実施例2による当該酵素ならびに比較の対象とした酵素がいずれも共通して還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有していることから、上記で見出された配列表における配列番号2及び3に示す部分アミノ酸配列が斯かる作用の発現に関与していることが示唆された。したがってこの結果は、こ



の発明の非還元性糖質生成酵素が、配列表における配列番号 2 及び 3 に示すアミノ酸配列を含有するとともに中温域に至適温度を有することにより特徴づけられることを示している。

#### 【0102】

【実施例 3-3】〈DNA を導入してなる形質転換体〉  
配列表における配列番号 7 に示す塩基酸配列における 5' 末端及び 3' 末端の配列に基づいて、それぞれ、配列表における配列番号 20 及び 21 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを常法にしたがい化学合成した。センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、これらのオリゴヌクレオチドをそれぞれ 85 ng と、鋳型として、実施例 3-2 の方法で得た組換え DNA『pGY 2』を 100 ng とを反応管で混合し、耐熱性 DNA ポリメラーゼ試薬（宝酒造製、商品名『Pyrobes t』）1.25 単位、同試薬に添付された緩衝液 5  $\mu$ l と dNTP 混合液 4  $\mu$ l をさらに加え、滅菌蒸留水で全量を 50  $\mu$ l として、PCR を行った。PCR の温度制御は、95℃1 分間の後、98℃20 秒間、70℃30 秒間及び 72℃4 分間を 25 サイクル、最後に、72℃10 分間とした。PCR 産物としての DNA を常法にしたがい回収して、約 2,300 塩基対の DNA を得た。この DNA と、予め制限酵素 EcoRI で切断し、宝酒造製『DNA Blunting Kit』を用いて平滑化しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK 223-3』とを混合し、通常のライゲーション法により連結した。引き続き、連結産物を常法にしたがって操作して、上記約 2,300 塩基対の DNA が挿入された組換え DNA を得た。得られた組換え DNA を通常のジデオキシ法により解読したところ、当該組換え DNA は、配列表の配列番号 7 に示す塩基配列における 5' 末端及び 3' 末端に、それぞれ、5'-ATG-3' 及び 5'-TGA-3' で示される塩基配列が付加された塩基配列を含有していた。当該組換え DNA を『pGY 3』と命名した。以上に示した組換え DNA『pGY 3』の構造は図 7 にまとめている。

【0103】組換え DNA『pGY 3』を、常法にしたがい予めコンピテント化しておいた大腸菌 LE392 株（ATCC 33572）に導入して形質転換体を得た。斯かる形質転換体より、通常のアルカリ-SDS 法により DNA を抽出し、抽出された DNA が『pGY 3』であることを常法にしたがって確認し、当該形質転換体を『GY 3』と命名した。斯くして、この発明の非還元性糖質生成酵素をコードする DNA を導入してなる形質転換体を得た。

#### 【0104】

【実施例 3-4】〈DNA を導入してなる形質転換体〉  
ファルマシア製プラスミドベクター『pKK 223-3』におけるプロモーターの 3' 末端側下流の塩基配列のもとづいて、配列表における配列番号 22 及び 23 に

示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを常法にしたがって合成し、それぞれの 5' 末端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて燐酸化した。燐酸化した該オリゴヌクレオチドを常法にしたがいがアニーリングさせた後、これと、あらかじめ制限酵素 EcoRI 及び PstI で切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK 223-3』とを通常のライゲーション法により連結した。常法にしたがいが、連結産物を大腸菌株に導入し、斯る大腸菌株を培養後、培養物から通常のアルカリ-SDS 法により DNA を抽出した。得られた DNA は、プラスミドベクター『pKK 223-3』と同様の構造を有する一方、そのプロモーターの下流に、制限酵素 EcoRI、XbaI、SpeI 及び PstI による認識配列をこの順序で含有していた。斯くして得た DNA をプラスミドベクター『pKK 4』と命名した。

【0105】配列表における配列番号 7 に示す塩基配列における 5' 末端及び 3' 末端部分の配列に基づいて化学合成した、配列番号 24 及び 25 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして用いたこと以外は実施例 3-3 と同様にして PCR を行った。PCR 産物としての DNA を常法にしたがいが回収して、約 2,300 塩基対の DNA を得た。この DNA を制限酵素 XbaI 及び SpeI で切断した後、これと、制限酵素 XbaI 及び SpeI であらかじめ切断しておいた上記プラスミドベクター『pKK 4』とを通常のライゲーション法により連結した。連結産物を常法にしたがって操作して、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列を含有する組換え DNA を得た。斯くして得た組換え DNA を『pKGY 1』と命名した。

【0106】引き続き、ロバート・エム・ホートンらが、『メソックス・イン・エンザイモロジー』、第 217 巻、270 乃至 279 頁（1993 年）に報告している、2 段階の PCR を適用する『オーバーラップ・エクステンション法』により、上記で得た組換え DNA『pKGY 1』における配列番号 7 の塩基配列の 5' 末端上流部分の塩基配列を改変した。先ず、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、プラスミドベクター『pKK 4』の塩基配列に基づいて常法にしたがいが化学合成した、配列表における配列番号 26 及び 27 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、鋳型として、上記で得た組換え DNA『pKGY 1』をそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3-3 と同様にして PCR を行った（「第 1 段 PCR-A」という）。これと並行して、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 7 の塩基配列に基づいてそれぞれ常法にしたがいが化学合成した、配列表における配列番号 28 及び 29 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、鋳型として、上記で得た組換え DNA『pKGY 1』をそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3-3

と同様にしてPCRを行った（「第1段PCR-B」という）。第1段PCR-Aの産物としてのDNAを常法にしたがって回収し、約390塩基対のDNAを得た。第1段PCR-Bの産物としてのDNAを常法にしたがい回収して、約930塩基対のDNAを得た。

【0107】鋳型として、第1段PCR-A及び第1段PCR-Bの産物として得たDNAの混合物を、センスプライマーとして、第1段PCR-Aで用いた配列表における配列番号26の塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表にお

ける配列番号7に示す塩基配列に基づき常法にしたがい化学合成した、配列表における配列番号30に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いたこと以外は、実施例3-3と同様にしてPCRを行った（「第2段PCR-A」という）。このPCRの産物としてのDNAを常法にしたがい回収し、約1,300塩基対のDNAを得た。

【0108】第2段PCR-Aの産物として得たDNAを制限酵素EcoRI及びBsiWIで切断し、生成した約650塩基対のDNAを常法にしたがい回収した。一方、上記で得た組換えDNA『pKGY1』を制限酵素EcoRI及びBsiWIで切断し、生成した約6,300塩基対のDNAを常法にしたがい回収した。これらのDNAを通常のライゲーション法により連結し、連結産物を常法にしたがい操作して、第2段PCR-Aの産物由来の約650塩基対のDNAを含有する組換えDNAを得た。通常のジデオキシ法によりDNAを解読したところ、得られた組換えDNAは、5'末端から3'末端に向けて、配列表における配列番号8に示す塩基配列、5'-ATG-3'で表される塩基配列、配列表における配列番号7に示す塩基配列及び、5'-TGA-3'で表される塩基配列が、この順序で連結された塩基配列を含有していた。斯くして得た組換えDNAを『pGY4』と命名した。なお、組換えDNA『pGY4』の構造は、配列表における配列番号8に示す塩基配列を含有すること以外は、実施例3-3の方法で得た組換えDNA『pGY3』の構造と実質的に同一である。

【0109】組換えDNA『pGY4』を、宝酒造製の大腸菌コンピテント細胞『BMH71-18mutS』に常法にしたがい導入して形質転換体を得た。斯る形質転換体より通常のアルカリ-SDS法によりDNAを抽出し、抽出されたDNAが『pGY4』であることを常法にしたがって確認し、当該形質転換体を『GY4』と命名した。斯くして、この発明の非還元性糖質生成酵素をコードするDNAを導入してなる形質転換体を得た。

【0110】

【実施例4】〈非還元性糖質生成酵素の製造〉

【0111】

【実施例4-1】〈アルスロバクター属微生物を用いる酵素の製造〉アルスロバクター・スピーシーズS34

(FERM BP-6450)を、実施例2-1の方法に準じて、ファーマンターで約72時間培養した。培養後、SF膜を用いて菌体を濃縮して約81の菌体懸濁液を回収し、更に、その菌体懸濁液を高圧菌体破碎装置（大日本製薬株式会社製、『ミニラボ』）で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離し、約8.51の遠心上清を得た。上清中の非還元性糖質生成酵素活性を測定したところ、培養物1ml当たりに換算すると、約0.1単位の当該酵素活性が認められた。この上清に飽和度約0.7になるように硫酸を加えて硫酸塩析し、遠心分離で沈殿物を回収し、10mM磷酸緩衝液（pH7.0）に溶解後、同緩衝液に対して透析した。得られた透析内液を、イオン交換樹脂量を約21としたこと以外は、実施例2-2に記載の陰イオン交換樹脂（三菱化学株式会社製、商品名『セパピーズFP-DA13ゲル』）を用いる方法に準じてイオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、非還元性糖質生成酵素活性画分を回収した。回収した画分を1M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析内液を遠心分離して形成された上清を回収した。回収した上清を、ゲル量を約300mlとしたこと以外は、実施例2-2に記載の疎水性ゲル（東ソー株式会社製、商品名『ブチルトヨパール650Mゲル』）を用いる方法に準じて疎水性カラムクロマトグラフィーに供し、非還元性糖質生成酵素活性画分を回収した。回収した酵素の至適温度が40℃を越え且つ60℃未満の範囲の中温域にあること及び、至適pHがpH7未満の酸性域にあることを確認した。斯くして、約2,600単位のこの発明の非還元性糖質生成酵素を得た。

【0112】

【実施例4-2】〈形質転換体を用いる酵素の製造〉16g/lポリペプトン、10g/l酵母エキス及び5g/l塩化ナトリウムを含む水溶液を500ml容三角フラスコに100ml入れ、オートクレーブで121℃で15分間処理し、冷却し、無菌的にpH7.0に調製した後、アンピシリンナトリウム塩10mgを無菌的に添加して液体培地を調製した。この液体培地に実施例3-2の方法で得た形質転換体『GY2』を接種し、37℃で約20時間通気攪拌培養したものを種培養物とした。次に101容ファーマンタに、種培養に用いたのと同じ組成の培地を種培養の場合に準じて71調製し、種培養物を70ml接種し、約20時間通気攪拌培養した。得られた培養物から、常法にしたがい、遠心分離して菌体を回収した。回収した菌体を、10mM磷酸緩衝液（pH7.0）に懸濁し、超音波処理して菌体を破碎し、さらに遠心分離により不溶物を除去し、上清を回収して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液を10mM磷酸緩衝液（pH7.0）に対して透析した。透析内液を回収し、回収した液が非還元性糖質生成酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が40℃を越え且つ60℃未満の範

囲の中温域にあること及び、至適 pH が pH 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明の非還元性糖質生成酵素を得た。本実施例における培養においては、培養物 1 ml 当たりに換算すると約 0.2 単位の当該酵素が産生されていた。

【0113】対照として、ストラタジーン・クローニング・システムズ製大腸菌『XL1-Blue』株を、アンピシリンを含まないこと以外は上記と同一の組成の培地を用い、上記と同一の条件で培養し、さらに上記と同様に菌体抽出液を得、透析した。得られた透析内液には、非還元性糖質生成酵素活性は認められなかった。このことは、形質転換体『GY2』がこの発明の非還元性糖質生成酵素の製造に有用であることを示している。

【0114】

【実施例 4-3】〈形質転換体を用いる酵素の製造〉実施例 3-3 の方法で得た形質転換体『GY3』を、1% (w/v) マルトース、3% (w/v) ポリペプトン、1% (w/v) 『ミースト PIG』(アサヒビール食品株式会社製)、0.1% (w/v) 燐酸一水素カリウム、100 µg/ml アンピシリン及び水からなる液体培地 (pH 7.0) を用いたこと以外は実施例 4-2 と同様にして培養した。得られた培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の非還元性糖質生成酵素活性を測定したところ、当該酵素は、培養物 1 ml 当たりに換算すると約 15 単位産生されていた。この上清を実施例 2-2 に記載の方法にしたがって精製し、この精製標品が非還元性糖質生成酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が 40℃を越え且つ 60℃未満の範囲の中温域にあること及び、至適 pH が pH 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明の非還元性糖質生成酵素を得た。

【0115】

【実施例 4-4】〈形質転換体を用いる酵素の製造〉実施例 3-4 の方法で得た形質転換体『GY4』を、2% (w/v) マルトース、4% (w/v) ペプトン、1% (w/v) 酵母エキス、0.1% 燐酸二水素ナトリウム、200 µg/ml アンピシリン及び水からなる液体培地 (pH 7.0) を用いたこと以外は実施例 4-2 と同様にして培養した。得られた培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の非還元性糖質生成酵素活性を測定したところ、当該酵素は、培養物 1 ml 当たりに換算すると約 60 単位産生されていた。この上清を実施例 2-2 に記載の方法にしたがって精製し、この精製標品が非還元性糖質生成酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が 40℃を越え且つ 60℃未満の範囲の中温域にあること及び、至適 pH が pH 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明の非還元性糖質生成酵素を得た。

【0116】

【実施例 5】〈トレハロース遊離酵素〉

【0117】

【実施例 5-1】〈酵素の産生〉実施例 2-1 の方法にしたがって、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) をファーメンターで培養した。引き続き、実施例 2-2 の方法にしたがって、得られた培養物の一部を採り、菌体と上清液に分離した後、菌体抽出液を得た。この培養上清と菌体抽出液のトレハロース遊離酵素活性を測定したところ、培養上清には当該酵素活性が僅かであるのに対して、菌体抽出液には当該酵素活性が、培養物 1 ml 当たりに換算して約 0.3 単位確認された。

【0118】

【実施例 5-2】〈酵素の精製〉実施例 2-1 の方法にしたがって得た培養物約 80 l を、8,000 rpm で 30 分間遠心分離することにより、湿重量で約 800 g の菌体を得た。その菌体を 2 l の 10 mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し超音波ホモジナイザー (株式会社エスエムテー製、『モデル UH-600』) で処理した。処理液を、10,000 rpm で 30 分間遠心分離し、その上清約 2 l を回収した。この上清液に飽和度 0.7 になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、24 時間放置した後、10,000 rpm で 30 分間遠心分離し、硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を 10 mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させた後、同じ緩衝液に対して 48 時間透析し、10,000 rpm で 30 分間遠心分離して不溶物を除去した。この透析内液約 1 l を、約 1.3 l の陰イオン交換樹脂 (三菱化学株式会社製、商品名『セバピーズ FPD-DA13 ゲル』) を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。溶出は、通液に伴い 0 M から 0.6 M まで直線的に濃度が上昇する食塩を含む 10 mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分のトレハロース遊離酵素活性を測定した。その結果、約 0.2 M の食塩を含む緩衝液でカラムから溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。

【0119】合一した溶液に硫酸を濃度 1 M になるように加えて 4℃で 12 時間放置した後、10,000 rpm で 30 分間遠心分離して上清を回収した。回収した上清を疎水性ゲル (東ソー株式会社製、商品名『ブチルトヨパール 650 M ゲル』) を用いる疎水性カラムクロマトグラフィーに供した。ゲル量は約 300 ml とした。ゲルは使用に先立って、1 M 硫酸を含む 10 mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した。溶出は、通液に伴い 1 M から 0 M まで直線的に濃度が下降する硫酸水溶液で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分のトレハロース遊離酵素活性を測定した。その結果、約 0.5 M の硫酸を含む緩衝液で溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。

【0120】合一した溶液を 10 mM 燐酸緩衝液 (pH

7. 0) に対して透析し、その透析内液を、10, 000 rpm で 30 分間遠心分離した。この上清を回収し、約 40 ml の陰イオン交換樹脂 (東ソー株式会社製、商品名『DEAE-トヨパール 650S ゲル』) を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。溶出は、通液に伴い 0 M から 0. 2 M まで直線的に濃度が上昇する食塩水溶液で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分のトレハロース遊離酵素活性を測定した。その結果、約 0. 15 M の食塩で溶出された画分に

顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。合一した液を引き続き、約 380 ml の『ウルトラゲル AcA 44 ゲル』 (フランス、セブラコル社製) を用いるゲル濾過クロマトグラフィーに供し、顕著な当該酵素活性の認められた画分を回収した。以上の、精製の各工程におけるトレハロース遊離酵素の酵素活性量、比活性、収率を表 5 に示す。

【0121】

【表 5】

工 程	トレハロース遊離酵素 の活性量 (単位)	比 活 性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
菌体の抽出液	24, 000	—	100
硫酸塩析後の透析内液	22, 500	0. 6	94
セパビーズカラム溶出液	15, 600	2. 0	65
疎水カラム溶出液	6, 400	25. 3	27
トヨパールカラム溶出液	4, 000	131	17
ゲル濾過溶出液	246	713	1. 0

【0122】上記のゲル濾過クロマトグラフィーで溶出され回収した溶液を、常法にしたがい、7. 5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、単一の蛋白質バンドが確認された。この結果は、上記で得た、ゲル濾過クロマトグラフィーからの溶出物が、電気泳動的に均質な状態にまで精製された、トレハロース遊離酵素の精製標品であることを示している。

【0123】

【実施例 5-3】 (酵素の性質)

【0124】

【実施例 5-3 (a)】 (作用) 後記実施例 8-3 の方法で得た、トレハロース構造有する非還元性糖質としての  $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロース及び、還元性糖質としてのマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースのいずれか 1 種の

糖質を固形分濃度 2% (w/v) となるよう水に溶解させて基質水溶液を調製した。それぞれの基質水溶液に、実施例 5-2 の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を基質固形分 1 g 当たり 2 単位の割合で加え、50℃、pH 6. 0 で 48 時間反応させた。反応産物を実施例 2-3 (a) の方法に準じて脱塩した後 HPLC で分析し、各反応産物中の糖質の組成比を求めた。結果を表 6 に示す。なお、表 6 においては、 $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び  $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースは、それぞれ、グルコシルトレハロース、マルトシルトレハロース、マルトリオシルトレハロース、マルトテトラオシルトレハロース及びマルトペンタオシルトレハロースと表示した。

【0125】

【表 6】

基 質	反 応 産 物	溶出時間 (分)	組成比 (%)
グルコシルトレハロース	トレハロース	48.5	16.8
	グルコース	57.2	8.2
	グルコシルトレハロース	43.3	75.0
マルトシルトレハロース	トレハロース	48.5	44.1
	マルトース	50.8	44.4
	マルトシルトレハロース	38.9	11.5
マルトリオシルトレハロース	トレハロース	48.5	40.5
	マルトリオース	46.2	59.0
	マルトリオシルトレハロース	35.4	0.5
マルトテトラオシルトレハロース	トレハロース	48.5	35.0
	マルトテトラオース	42.1	64.2
	マルトテトラオシルトレハロース	32.7	0.3
マルトヘキサオシルトレハロース	トレハロース	48.5	29.5
	マルトヘキサオース	38.2	70.2
	マルトヘキサオシルトレハロース	30.2	0.3
マルトリオース	マルトリオース	48.2	100.0
マルトテトラオース	マルトテトラオース	42.1	100.0
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	38.2	100.0
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	35.2	100.0
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	32.6	100.0

【0126】表6の結果から明らかなように、実施例5-2の方法で得たトレハロース遊離酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解し、トレハロースとグルコース重合度1以上の還元性糖質とを生成した。一方、マルトリオース以下のマルトオリゴ糖は、トレハロース遊離酵素によって全く作用をうけなかった。

【0127】

【実施例5-3(b)】〈分子量〉実施例5-2の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を、分子量マーカー（日本バイオ・ラド・ラボラトリーズ株式会社製）と並行して、10%（w/v）ポリアクリルアミドゲルを用いる、通常のSDS-PAGEに供した。泳動後、分子量マーカーの泳動位置と比較した結果、当該酵素の分子量は約62,000±5,000ダルトンであった。

【0128】

【実施例5-3(c)】〈等電点〉実施例5-2の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を、常法にしたがい、両性電解質『アンフォライン』（スウエーデン

国、ファルマシア・エルケイビー社製）を2%（w/v）の濃度で含有するポリアクリルアミドゲルを用いる等電点電気泳動に供した。泳動後、ゲルのpHを測定した結果、当該酵素の等電点は約4.7±0.5であった。

【0129】

【実施例5-3(d)】〈至適温度及び至適pH〉実施例5-2の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を用いて、当該酵素活性に対する温度の影響及びpHの影響を調べた。温度の影響を調べる際には、適宜の各温度で反応させたこと以外は活性測定法にしたがって操作した。pHの影響を調べる際には、適宜の20mM緩衝液を用いて適宜の各pH条件下で反応させたこと以外は活性測定法にしたがって操作した。それぞれの操作において、各反応系に認められた還元力の増加量の相対値（%）を算出し、相対酵素活性（%）とした。結果を図8（温度の影響）及び図9（pHの影響）に示す。図8で横軸は反応温度を、図9で横軸は反応pHをそれぞれ示す。図8に示されるように、当該酵素の至適温度は、pH6.0、30分間反応で、約50℃乃至約55℃付近であった。図9に示されるように、当該酵素の至適p

Hは、50℃、30分間反応でpH約6.0付近であった。

#### 【0130】

【実施例5-3(e)】〈温度安定性及びpH安定性〉  
実施例5-2の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を用いて、当該酵素の温度安定性及びpH安定性を調べた。温度安定性は、当該酵素の精製標品を20mM 燐酸緩衝液(pH7.0)で希釈し、適宜の各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定して調べた。pH安定性は、当該酵素の精製標品を適宜の各pHの50mM緩衝液で希釈し、4℃で24時間保持した後、pHを6に調整し、残存する酵素活性を測定して調べた。結果を図10(温度安定性)及び図11(pH安定性)に示す。図10で横軸は酵素の保持温度を、図11で横軸は酵素の保持pHをそれぞれ示す。図10に示されるように、当該酵素は約50℃付近まで安定であった。図11に示されるように、当該酵素は、pH約4.5乃至約10.0の範囲で安定であった。

【0131】以上の結果は、実施例5-2の方法で得たトレハロース遊離酵素が、中温域に至適温度を有するこの発明のトレハロース遊離酵素であることを示している。

#### 【0132】

【実施例5-4】〈部分アミノ酸配列〉実施例5-2の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品の一部を蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約80μgをN末端アミノ酸配列分析用の試料とした。N末端アミノ酸配列は、『プロテインシーケンサー モデル473A』(米国、アプライドバイオシステムズ社製造)を用い、N末端から20残基まで分析した。得られた配列は、配列表における配列番号14に示すアミノ酸配列であった。

【0133】実施例5-2の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品の一部を10mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)に対して透析した後、限外濾過膜(東ソー株式会社製、商品名『ウルトラセントー30』)を用い、常法にしたがい操作して、濃度約1mg/mlにまで濃縮した。この濃縮液(0.2ml)に10μgのリジルエンドペプチダーゼ試薬(和光純薬株式会社販売)を加え、30℃、22時間反応させて当該酵素を消化し、ペプチドを生成させた。反応産物を、『ノバパックC18カラム』(直径4.5mm×長さ150mm、ウォーターズ社製)を用いる逆相HPLCに供し、ペプチドを分離した。温度は室温で行った。溶出は、通液に伴い60分間で24%(v/v)から48%(v/v)まで直線的に濃度が上昇するアセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸水溶液で、流速0.9ml/分で行った。カラムから溶出されたペプチドは、波長210nmの吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した2個のペプチド、『RT1

8』(保持時間約18分)及び『RT33』(保持時間約33分)を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200μlの0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸を含む50%(v/v)アセトニトリル水溶液に溶解した。これらのペプチド溶液をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ20残基までアミノ酸配列を分析した。ペプチド『RT18』からは、配列表における配列番号15に示すアミノ酸配列が、またペプチド『RT33』からは、配列表における配列番号16に示すアミノ酸配列が得られた。

#### 【0134】

【実施例6】〈トレハロース遊離酵素をコードするDNA〉

#### 【0135】

【実施例6-1】〈遺伝子ライブラリーの作製と検索〉  
実施例3-1の方法にしたがって、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)の遺伝子ライブラリーを作製した。引き続き、この遺伝子ライブラリーを、プローブとしてこの発明のトレハロース遊離酵素をコードし得る塩基配列のオリゴヌクレオチドを下記のとおり調製して用いたこと以外は実施例3-1に記載の条件でコロニーハイブリダイゼーション法を実施して検索した。プローブは、実施例5-4で明らかにした、配列表の配列番号15に示すアミノ酸配列における第12乃至20番目のアミノ酸からなる配列に基づいて化学合成した、配列表における配列番号31に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、常法にしたがい[γ-<sup>32</sup>P]ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて同位体標識して調製した。斯かるプローブと顕著なハイブリダイゼーションを示した形質転換体を選択した。

【0136】実施例3-2の方法にしたがって、上記で選択した形質転換体より組換えDNAを抽出し、本実施例におけるプローブを用いて通常のサザン分析法により分析した。分析の結果に基づき作成した制限酵素地図は、図5に示した実施例3-1乃至3-2で得た組換えDNA『pGY1』の場合と一致した。そして、図5に示されるように、本実施例による組換えDNAは、図中斜線矢印で示される、この発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列を、制限酵素PstI及びKpnIによる認識部位の間の約2,200塩基対からなる領域内に含有していることが判明した。そこで、以下、組換えDNA『pGY1』を用いて、この発明のトレハロース遊離酵素をコードするDNAの塩基配列の解読を進めた。

#### 【0137】

【実施例6-2】〈塩基配列の解読〉実施例3-2の方法で得た組換えDNA『pGY1』を、常法にしたがい、制限酵素PstIで完全に消化した。消化産物を、通常のアガロースゲル電気泳動法を用いて、生成された約3,300塩基対のDNA断片を除去し、生成された

約 5, 200 塩基対の DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片を常法にしたがって連結反応に供し、常法にしたがって連結産物でストラタジーン・クローニング・システムズ製大腸菌株『XL1-Blue』株を形質転換した。得られた形質転換体より常法により組換え DNA を抽出した。この組換え DNA が、この発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列を含む約 2, 200 塩基対からなる領域を含有することを常法により確認し、『pGZ2』と命名した。ここで得た、組換え DNA 『pGZ2』が導入されてなる形質転換体を『GZ2』と命名した。

【0138】組換え DNA 『pGZ2』の塩基配列を、通常のジデオキシ法により分析したところ、当該組換え DNA は、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) に由来する、配列表における配列番号 32 に示す、2, 218 塩基対からなる塩基配列を含有していた。この塩基配列は、配列番号 32 に併記したアミノ酸配列をコードし得るものであった。このアミノ酸配列と、実施例 5-4 で確認されたこの発明のトレハロース遊離酵素の部分アミノ酸配列である、配列表における配列番号 14 乃至 16 のアミノ酸配列とを比較した。その結果、配列表における配列番号 14、15 及び 16 に示すアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号 32 に併記したアミノ酸配列における第 1 乃至 20 番目、第 298 乃至 317 番目及び第 31 乃至 50 番目のアミノ酸配列と完全に一致した。以上のことは、実施例 5 で得たこの発明のトレハロース遊離酵素が、配列表における配列番号 32 に併記したアミノ酸配列、すなわち、配列番号 9 に示すアミノ酸配列を有することを示している。また、以上のことは、当該酵素は、アルスロバク

ター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) においては、配列表における配列番号 32 に示す塩基配列における第 477 乃至 2, 201 番目の塩基からなる配列、すなわち、配列番号 17 に示す塩基配列によりコードされていることをも示している。以上に示した組換え DNA 『pGZ2』の構造は図 12 にまとめている。

【0139】実施例 5 の方法で得られるこの発明のトレハロース遊離酵素の、上記で明らかにしたアミノ酸配列と、トレハロース遊離酵素としての作用を有する公知の他の酵素のアミノ酸配列とを、実施例 3-2 に準じて比較し、それぞれ相同性 (%) を求めた。公知の酵素として、特開平 7-298880 号公報に開示されたアルスロバクター・スピーシーズ Q36 由来のもの、特開平 7-298880 号公報に開示されたリゾビウム・スピーシーズ M-11 由来のもの、特開平 8-336388 号公報に開示されたスルフォロバス・アシドカルダリウス ATCC 33909 由来のもの及び、再公表特許 WO 95/34642 号公報に開示されたスルフォロバス・ソルファタリカス KM1 由来のものをを用いた。以上の公知の酵素は上記公報に記載のとおり、いずれも中温域以外に至適温度を有するものである。なお、以上の公知の酵素のアミノ酸配列は、米国国立予衛生研究所作成の DNA データベース『ジェンバンク (GenBank)』から、それぞれのアクセッション番号『D63343』、『D64130』、『D78001』及び『D83245』により入手することもできる。求められた相同性を表 7 に示す。

【0140】

【表 7】

アミノ酸配列(*)の比較の対象とした酵素の由来	アミノ酸配列の相同性
<i>Arthrobacter</i> sp. Q36 (D63343)	59.9%
<i>Rhizobium</i> sp. W-11 (D78001)	59.1%
<i>Sulfolobus solfataricus</i> KM1 (D64130)	37.7%
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ATCC 33909 (D83245)	36.0%

\*: 括弧内には、データベース『ジェンバンク』におけるそれぞれのアクセッション番号を示した。

【0141】表 7 に示すように、実施例 5 によるこの発明のトレハロース遊離酵素は、中温域以外に至適温度を有する公知の酵素のうちではアルスロバクター・スピーシーズ Q36 由来の酵素と最も高い 59.9% というアミノ酸配列の相同性を示した。この結果は、この発明のトレハロース遊離酵素が、配列番号 9 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を通常は含有することを意味している。また、アミノ酸配列の比較結果から、実施例 5 による当該酵素と上記の 4 種類の公知の酵素は、配列表における配列番号 10 及び 13 に示すアミノ酸配列を共通して含有していることが判明した。実施例 5 による当該酵素は、配列表における配列番号 9 のアミノ酸配列における第 148 乃至 153

番目、第 185 乃至 190 番目、第 248 乃至 254 番目及び第 285 乃至 291 番目のアミノ酸からなる部分に見られるとおり、配列番号 10 乃至 13 のアミノ酸配列を部分アミノ酸配列として含有している。上記で比較の対象とした 4 種類の酵素も、いずれも、それぞれ対応する部分にこれらの部分アミノ酸配列を含有している。実施例 5 による当該酵素ならびに比較の対象とした酵素がいずれも共通して、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有していることから、上記で見出された配列表における配列番号 10 及び 13 に示す部分アミノ酸配列が斯かる作用の発現に関わっていることが示唆され

た。したがってこの結果は、この発明のトレハロース遊離酵素が、配列表における配列番号 10 及び 13 に示すアミノ酸配列を含有するとともに中温域に至適温度を有することにより特徴づけられることを示している。

#### 【0142】

【実施例 6-3】〈DNAを導入してなる形質転換体〉  
配列表における配列番号 17 に示す塩基配列における 5' 末端及び 3' 末端の配列に基づいて、それぞれ、配列表における配列番号 33 及び 34 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを常法にしたがい化学合成した。センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、これらのオリゴヌクレオチドそれぞれ 85 ng と、鋳型として、実施例 6-2 の方法で得た組換え DNA『pGZ2』100 ng とを反応管で混合し、他の試薬の添加量は実施例 3-3 に準じて PCR を行った。PCR の温度制御は、95℃ 1 分間の後、98℃ 20 秒間、70℃ 30 秒間及び 72℃ 4 分間を 25 サイクル、最後に 72℃ 10 分間とした。PCR 産物における DNA を常法にしたがい回収して、約 1,700 塩基対の DNA を得た。この DNA と、予め制限酵素 EcoRI で切断し、宝酒造製『DNA Blunting Kit』を用いて平滑化しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK233-3』とを混合し、通常のライゲーション法により連結した。引き続き、連結産物を常法にしたがって操作して、上記の約 1,700 塩基対の DNA が挿入された組換え DNA を得た。得られた組換え DNA を通常のジデオキシ法により解読したところ、当該組換え DNA は、配列表の配列番号 17 に示す塩基配列における 3' 末端に 5'-TGA-3' で示される塩基配列が付加された塩基配列を含有していた。当該組換え DNA を『pGZ3』と命名した。以上に示した組換え DNA『pGZ3』の構造は図 13 にまとめている。

【0143】組換え DNA『pGZ3』を、常法にしたがい予めコンピテント化しておいた大腸菌 LE392 株 (ATCC 33572) に導入して形質転換体を得た。斯かる形質転換体より、通常のアルカリ-SDS 法により DNA を抽出し、抽出された DNA が『pGZ3』であることを常法にしたがって確認し、当該形質転換体を『GZ3』と命名した。斯くして、この発明のトレハロース遊離酵素をコードする DNA を導入してなる形質転換体を得た。

#### 【0144】

【実施例 6-4】〈DNAを導入してなる形質転換体〉  
配列表における配列番号 17 に示す塩基配列における 5' 末端及び 3' 末端部分の配列に基づいて化学合成した、配列番号 35 及び 36 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして用いたこと以外は実施例 6-3 と同様にして PCR を行った。PCR 産物としての DNA を常法にしたがい回収して、約 1,700 塩基対の DNA を

得た。この DNA を制限酵素 XbaI 及び SpeI で切断した後、これと、制限酵素 XbaI 及び SpeI であらかじめ切断しておいた、実施例 3-4 の方法で得たプラスミドベクター『pKK4』とを、通常のライゲーション法により連結した。連結産物を常法にしたがって操作して、配列表における配列番号 17 に示す塩基配列を含有する組換え DNA を得た。斯くして得た組換え DNA を『pKGZ1』と命名した。

【0145】引き続き、実施例 3-4 と同様に、『オーバーラップ・エクステンション法』により上記で得た組換え DNA『pKGZ1』における配列番号 17 の塩基配列の 5' 末端上流部分の塩基配列を改変した。まず、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、プラスミドベクター『pKK4』の塩基配列に基づいて常法にしたがい化学合成した、配列表における配列番号 26 及び 37 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、鋳型として、上記で得た組換え DNA『pKGZ1』をそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3-3 と同様にして PCR を行った（「第 1 段 PCR-C」という）。これと並行して、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 17 の塩基配列に基づいてそれぞれ常法にしたがい化学合成した、配列表における配列番号 38 及び 39 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、鋳型として、上記で得た組換え DNA『pKGZ1』をそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3-3 と同様にして PCR を行った（「第 1 段 PCR-D」という）。第 1 段 PCR-C の産物としての DNA を常法にしたがって回収し、約 390 塩基対の DNA を得た。第 1 段 PCR-D の産物としての DNA を常法にしたがい回収して、約 590 塩基対の DNA を得た。

【0146】鋳型として、第 1 段 PCR-C 及び第 1 段 PCR-D の産物として得た DNA の混合物を、センスプライマーとして、第 1 段 PCR-C で用いた配列表における配列番号 26 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、第 1 段 PCR-D で用いた配列表における配列番号 39 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3-3 と同様にして PCR を行った（「第 2 段 PCR-B」という）。この PCR の産物としての DNA を常法にしたがい回収し、約 950 塩基対の DNA を得た。

【0147】第 2 段 PCR-B の産物として得た DNA を制限酵素 EcoRI で切断し、生成した約 270 塩基対の DNA を常法にしたがい回収した。一方、上記で得た組換え DNA『pKGZ1』を制限酵素 EcoRI で切断し、生成した約 6,100 塩基対の DNA を常法にしたがい回収した。これらの DNA を通常のライゲーション法により連結し、連結産物を常法にしたがい操作して、第 2 段 PCR-B の産物由来の約 270 塩基対の DNA を含有する組換え DNA を得た。通常のジデオキシ



法によりDNAを解読したところ、得られた組換えDNAは、5'末端から3'末端に向けて、配列表における配列番号8に示す塩基配列、配列表における配列番号17に示す塩基配列及び、5'-TGA-3'で表される塩基配列がこの順序で連結された塩基配列を含有していた。斯くして得た組換えDNAを『pGZ4』と命名した。なお、組換えDNA『pGZ4』の構造は、配列表における配列番号8に示す塩基配列を含有すること以外は、実施例6-3の方法で得た組換えDNA『pGZ3』の構造と実質的に同一である。

【0148】組換えDNA『pGZ4』を、宝酒造製の<sup>10</sup>大腸菌コンピテント細胞『BMH71-18mutS』に常法にしたがい導入して形質転換体を得た。斯る形質転換体より通常のアルカリ-SDS法によりDNAを抽出し、抽出されたDNAが『pGZ4』であることを常法にしたがって確認し、当該形質転換体を『GZ4』と命名した。斯くして、この発明のトレハロース遊離酵素をコードするDNAを導入してなる形質転換体を得た。

【0149】

【実施例7】〈トレハロース遊離酵素の製造〉

【0150】

【実施例7-1】〈アルスロバクター属微生物を用いる酵素の製造〉アルスロバクター・スピーシーズS34

(FERM BP-6450)を、実施例2-1の方法にしたがって、ファーマンターで約72時間培養した。培養後、SF膜を用いて菌体を濃縮して約8lの菌体懸濁液を回収し、更に、その菌体懸濁液を高圧菌体破碎装置(大日本製薬株式会社製、『ミニラボ』)で処理して菌体を破碎し、菌体破碎物を得た。この菌体破碎物を遠心分離し、形成された上清約8.5lを回収し、菌体抽出液を得た。得られた菌体抽出液のトレハロース遊離酵素活性を測定したところ、培養物1mlあたりに換算すると、約0.3単位の当該酵素活性が認められた。この菌体抽出液に飽和度約0.7になるように硫酸を加えて硫酸塩析し、遠心分離で沈殿物を回収し、10mM磷酸緩衝液(pH7.0)に溶解後、同緩衝液に対して透析した。得られた透析内液を、イオン交換樹脂量を約2lとしたこと以外は、実施例5-2に記載の陰イオン交換樹脂(三菱化学株式会社製、商品名『セパビーズFP-DA13ゲル』)を用いる方法に準じてイオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、トレハロース遊離酵素活性画分を回収した。回収した画分を1M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析内液を遠心分離して形成された上清を回収した。回収した上清を、ゲル量を約350mlとしたこと以外は、実施例5-2に記載の疎水性ゲル(東ソー株式会社製、商品名『ブチルトヨパール650Mゲル』)を用いる方法に準じて疎水性カラムクロマトグラフィーに供し、トレハロース遊離酵素活性画分を回収した。回収した酵素が45℃を越え且つ60℃未満の範囲の中温域に至適温度を有することと、pH7

未満の酸性域に至適pHを有することを確認した。斯くして、約6,400単位のこの発明のトレハロース遊離酵素を得た。

【0151】

【実施例7-2】〈アルスロバクター属微生物を用いる酵素の製造〉実施例7-1の方法にしたがって、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)を培養した。培養物1lに対して100mgのリゾチーム剤(長瀬産業製、商品名『卵白リゾチーム』)を加えた後、通気を停止し、温度・攪拌条件は培養の場合と同じ条件下で培養物を24時間処理して菌体を破碎した。この菌体破碎物を10,000rpmの連続遠心分離に供して上清を回収し、菌体抽出液を得た。引き続き実施例7-1の方法にしたがって、斯かる菌体抽出液を硫酸塩析に供し、塩析物を透析し、透析内液を『セパビーズFP-DA13ゲル』(三菱化学株式会社製)を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供してトレハロース遊離酵素活性画分を回収した。回収した画分は、この発明のトレハロース遊離酵素を約16,500単位とともに、この発明の非還元性糖質生成酵素を約5,500単位含むものであった。斯くして、この発明の非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素を含有する酵素剤を得た。

【0152】

【実施例7-3】〈形質転換体を用いる酵素の製造〉16g/lポリペプトン、10g/l酵母エキス及び5g/l塩化ナトリウムを含む水溶液を500ml容三角フラスコに100ml入れ、オートクレーブで121℃で15分間処理し、冷却し、無菌的にpH7.0に調製した後、アンピシリンナトリウム塩10mgを無菌的に添加して液体培地を調製した。この液体培地に実施例6-2の方法で得た形質転換体『GZ2』を接種し、37℃で約20時間通気攪拌培養したものを種培養物とした。次に10l容ファーマンターに、種培養に用いたのと同じ組成の培地を種培養の場合に準じて7l調製し、種培養物を70ml接種し、約20時間通気攪拌培養した。得られた培養物から、常法にしたがい、遠心分離して菌体を回収した。回収した菌体を、10mM磷酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、超音波処理して菌体を破碎し、さらに遠心分離により不溶物を除去し、上清を回収して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液を10mM磷酸緩衝液(pH7.0)に対して透析した。透析内液を回収し、回収した液がトレハロース遊離酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が45℃を越え且つ60℃未満の範囲の中温域にあること及び、至適pHがpH7未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明のトレハロース遊離酵素を得た。本実施例における培養においては、培養物1mlあたりに換算すると約0.5単位の当該酵素が産生されていた。

【0153】対照として、ストラタジーン・クローニン

グ・システムズ製大腸菌『XL1-Blue』株を、アンピシリンを含まないこと以外は上記と同一の組成の培地を用い、上記と同一の条件で培養し、さらに上記と同様に菌体抽出液を得、透析した。得られた透析内液には、トレハロース遊離酵素は認められなかった。このことは、形質転換体『GZ2』がこの発明のトレハロース遊離酵素の製造に有用であることを示している。

#### 【0154】

【実施例 7-4】〈形質転換体を用いる酵素の製造〉実施例 6-3 の方法で得た形質転換体『GZ3』を、1% (w/v) マルトース、3% (w/v) ポリペプトン、1% (w/v) 『ミースト PIG』（アサヒビール食品株式会社製）、0.1% (w/v) 磷酸一水素カリウム、100  $\mu$ g/ml アンピシリン及び水からなる液体培地 (pH 7.0) を用いたこと以外は実施例 7-3 と同様にして培養した。得られた培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中のトレハロース遊離酵素活性を測定したところ、当該酵素は、培養物 1 ml 当りに換算すると約 70 単位産生されていた。この上清を実施例 5-2 に記載の方法にしたがって精製し、この精製標品がトレハロース遊離酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が 45℃を越え且つ 60℃未満の範囲の中温域にあること及び、至適 pH が pH 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明のトレハロース遊離酵素を得た。

#### 【0155】

【実施例 7-5】〈形質転換体を用いる酵素の製造〉実施例 6-4 の方法で得た形質転換体『GZ4』を、実施例 4-4 の方法で培養した。得られた培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中のトレハロース遊離酵素活性を測定したところ、当該酵素は、培養物 1 ml 当りに換算すると約 250 単位産生されていた。この上清を実施例 5-2 に記載の方法にしたがって精製し、この精製標品がトレハロース遊離酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が 45℃を越え且つ 60℃未満の範囲の中温域にあること及び、至適 pH が pH 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明のトレハロース遊離酵素を得た。

#### 【0156】

【実施例 8】〈糖質の製造〉

#### 【0157】

【実施例 8-1】〈非還元性糖質含有シラップの製造〉濃度 6% (w/w) の馬鈴薯澱粉乳を加熱して糊化した後、pH 4.5、温度 50℃に調整し、澱粉固形分 1 g 当たり 2,500 単位のイソアミラーゼ剤（株式会社林原生物化学研究所製）を加えて 20 時間反応させた。反応物を pH 6.5 に調整し、120℃で 10 分間オートクレーブした後、40℃まで冷却し、同温度に維持しつつ、これに、澱粉固形分 1 g 当たり 150 単位の液化型  $\alpha$ -アミラーゼ剤（ノボ・ノルディスク・インダストリ

一製、商品名『ターマミール 60L』）を加えて 20 時間反応させた。この反応物を 120℃で 20 分間オートクレーブした後、53℃まで冷却し、pH 5.7 に調整後、同温度に維持しつつ、澱粉固形分 1 g 当たり 1 単位の実施例 4-1 の方法で得た非還元性糖質生成酵素を加えて 96 時間反応させた。斯くして得た反応物を 97℃で 30 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過した後、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製し、濃縮して固形分濃度約 70% (w/w) のシラップ状物を原料澱粉固形分当たり約 90% の収率で得た。

【0158】DE が 24 と低く、非還元性糖質として  $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び  $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースを固形分当たりそれぞれ 11.5%、5.7%、29.5%、3.5% 及び 2.8% 含む本品は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

#### 【0159】

【実施例 8-2】〈非還元性糖質含有シラップの製造〉濃度 3.3% (w/w) のとうもろこし澱粉乳に最終濃度 0.1% (w/w) となるように炭酸カルシウムを加え、pH 6.5 に調整後、これに、澱粉固形分当たり 0.2% (w/w) の液化型  $\alpha$ -アミラーゼ剤（ノボ・ノルディスク・インダストリー製、商品名『ターマミール 60L』）を加えて 95℃で 15 分間反応させて澱粉を液化した。この澱粉液化液を 120℃で 10 分間オートクレーブした後、53℃に冷却し、同温度に維持しつつ、澱粉固形分 1 g 当たり、1 単位のシュードモナス・スツッチェリ由来マルトテオラオース生成  $\alpha$ -アミラーゼ剤（株式会社林原生物化学研究所製）及び 2 単位の実施例 4-2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素を加えて 48 時間反応させた。引き続き反応物に、澱粉固形分 1 g 当たり 15 単位の  $\alpha$ -アミラーゼ剤（上田化学製、商品名『 $\alpha$ -アミラーゼ 2A』）を加え、65℃でさらに 2 時間反応させた後、120℃で 10 分間オートクレーブし、次いで冷却した。斯くして得た反応物を濾過した後、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製し、濃縮して固形分濃度約 70% (w/w) のシラップを原料澱粉固形分当たり約 90% の収率で得た。

【0160】DE が 18.5 と低く、非還元性糖質として  $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び  $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースを固形分当たりそれぞれ 9.3%、30.1%、0.9%、0.8% 及び 0.5% 含む本品

は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

#### 【0161】

【実施例 8-3】〈非還元性糖質の製造〉マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース（いずれも株式会社林原生物化学研究所製）のいずれかの還元性澱粉部分分解物の 20% (w/w) 水溶液それぞれに、還元性澱粉部分分解物の固形分 1 g 当たり 2 単位ずつの実施例 2-2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を加え、50℃、pH 6.0 で 48 時間作用させ、それぞれの還元性澱粉部分分解物から、非還元性糖質としての  $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び  $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースを生成させた。これら反応物を、それぞれ、常法に従って、加熱による酵素失活、濾過、脱色、脱塩、濃縮した後、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂 (Na<sup>+</sup>型、架橋度 4%、東京有機化学工業株式会社製、商品名『XT-1016』) を用いるカラムクロマトグラフィーに供し、反応物中の糖質を分画した。このカラムクロマトグラフィーにおいて、カラム内温度は 55℃、糖液の樹脂に対する負荷量は約 5% (v/v) とし、移動相として 55℃の温水を SV、0.13 の流速で通液した。カラムからの溶出液の内、固形分重量当りの上記のいずれかの非還元性糖質の組成比が 95%

(w/w) 以上の溶出液をそれぞれ採取した。採取したそれぞれの溶出液に水酸化ナトリウムを 0.1 N になるように加え、100℃で 2 時間加熱して残存する還元性糖質を分解した。斯くして得た反応物を、それぞれ、活性炭にて脱色し、H 型及び OH 型のイオン交換樹脂で脱塩し、濃縮、真空乾燥の後、粉碎して、純度 99.0% 以上の  $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び  $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロース粉末を得た。

【0162】高純度の非還元性糖質を含み、DE の極めて低いこれらの製品は、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

#### 【0163】

【実施例 8-4】〈非還元性糖質を含む結晶性粉末の製造〉マルトペンタオース（株式会社林原生物化学研究所製）の 20% (w/w) 水溶液を調製した。この水溶液に、マルトペンタオース固形分 1 g 当たり 2 単位の実施例 4-3 の方法で得た非還元性糖質生成酵素を加え、50℃で 48 時間反応させた。この反応によりマルトペンタオースの約 75% が  $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロ-

スに変換された。この反応物を 97℃で 30 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製した。

【0164】その後、60℃で減圧しながら固形分濃度約 75% (w/w) まで濃縮し、種結晶として  $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース結晶を約 0.01% (w/v) 加え、24 時間放置した後、晶出した  $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース結晶を遠心分離で回収し、さらに少量の冷水で洗浄した後、常法により乾燥して非還元性糖質含量の高い結晶性粉末を原料固形分当たり約 50% の収率で得た。

【0165】DE が 0.2 未満と極めて低く、非還元性糖質として  $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロースを固形分当たり 99.0% (w/w) 以上含む低甘味の本品は、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

#### 【0166】

【実施例 8-5】〈含水結晶トレハロースの製造〉トウモロコシ澱粉を 30% (w/w) になるように水中に懸濁し、懸濁液に炭酸カルシウムを 0.1% (w/w) 加えた。pH 6.0 に調整後、澱粉固形分当たり 0.2% (w/w) の液化型  $\alpha$ -アミラーゼ剤（ノボ・ノルディスク・インダストリー製、商品名『ターマミール 60 L』) を加え、95℃で 15 分間反応させて澱粉を糊化・液化した。得られた澱粉液化液を 120℃で 30 分間オートクレープした後、51℃に冷却し、pH 5.7 に調整後、同温度で維持しつつ、澱粉固形分 1 g 当たり、300 単位のイソアミラーゼ剤（株式会社林原生物化学研究所製）、2 単位のシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ剤（株式会社林原生物化学研究所製）、2 単位の実施例 4-1 の方法で得た非還元性糖質生成酵素及び、10 単位の実施例 7-1 の方法で得たトレハロース遊離酵素を加え、64 時間反応させた。この反応物を 97℃で 30 分間加熱して酵素を失活させた後、50℃に調整し、澱粉固形分 1 g 当たり 10 単位のグルコアミラーゼ剤（ナガセ生化学工業製、商品名『グルコチーム』) を加えて 24 時間反応させた。斯くして得た反応物を 95℃で 10 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製し、固形分濃度約 60% (w/w) まで濃縮して、固形分当たりトレハロースを 84.1% (w/w) 含むシラップを得た。このシラップを減圧下で固形分濃度約 83% (w/w) にまで濃縮し、助晶機にとり、シラップの容量に対して約 0.1% (w/v) の含水結晶トレハロースを種晶として加えて約 2 時間攪拌助晶した。晶出したトレハロースを遠心分離で回収し、少量の水で洗い蜜を除き、45℃の温風で乾燥させ、純度約 99% のトレ

ハロースの含水結晶を原料澱粉当たり約 50 % の収率で得た。

【0167】本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0168】

【実施例 8-6】〈無水結晶トレハロースを含む結晶性粉末の製造〉実施例 8-5 の方法でトレハロースの含水結晶を調製し、これを、ジャケット付き回転式真空乾燥機を用いて減圧乾燥した。減圧乾燥は、温度 90℃、気圧 -300 乃至 -350 mmHg の条件で、約 7 時間行った。減圧乾燥後、温度を常温に、気圧を常圧に戻して、製品を回収し、製品重量当たり無水結晶トレハロースを 90 % (w/w) 以上含む結晶性粉末を得た。

【0169】無水結晶トレハロースには含水物の水分を吸収し、トレハロース含水結晶に変わる性質がある。無水結晶トレハロース含量の高い本品は、水分を含有している飲食物、化粧品及び医薬品をはじめとする各種組成物ならびにそれら組成物の原料及び中間加工物を脱水又は乾燥するための安全で無害な脱水剤として有用である。また、まろやかで上品な甘味を有する本品は、甘味剤、呈味改善剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品及び医薬品をはじめとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0170】

【実施例 8-7】〈トレハロース含有シラップの製造〉濃度 27 % (w/w) のタピオカ澱粉乳に、最終濃度 0.1 % (w/w) となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH 6.0 に調整し、これに、澱粉固形分当たり 0.2 % (w/w) の液化型  $\alpha$ -アミラーゼ剤（ノボ・ノルディスク・インダストリー製、商品名『ターマミール 60L』）を加え、95℃で 15 分間反応させ、澱粉を糊化・液化した。この澱粉液化液を 2 kg/cm<sup>2</sup> で 30 分間オートクレーブした後、53℃に冷却し、pH 5.7 に調整し、同温度に維持しつつ、これに、澱粉固形分 1 g 当たり、500 単位のプルナーゼ剤（ノボ・ノルディスク・インダストリー製、商品名『プロモザイム 200L』）、1 単位のシュドモナス・スツチェリ由来のマルトテトラオース生成アミラーゼ剤（株式会社林原生物化学研究所製）及び、約 2 単位の非還元性糖質生成酵素とともに約 6 単位のトレハロース遊離酵素を含有する実施例 7-2 の方法で得た酵素剤を加えて 72 時間反応させた。斯くして得た反応物を 97℃で 15 分間保った後、冷却し、濾過して濾液を採取した。この濾液を、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製し、更に濃縮して固形分濃度 70 % (w/w) のシラップを、原料固形分当たり約 92 % の収率で得た。

【0171】本品は固形分当たりトレハロースを 35.

2 %、 $\alpha$ -グルコシルトレハロースを 3.4 %、グルコースを 1.8 %、マルトースを 37.2 %、マルトトリオースを 9.1 % およびマルトテトラオース以上のオリゴ糖を 13.3 % 含有しており、まろやかで上品な甘味、低い還元性、低い粘度、適度の保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0172】

【実施例 8-8】〈無水結晶トレハロースを含む結晶性粉末の製造〉アミロース（株式会社林原生物化学研究所製、商品名『EX-I』）1 重量部を水 15 重量部に加熱溶解し、温度 53℃、pH 5.7 に調整した。これに、アミロース固形分 1 g 当たり、2 単位の実施例 4-3 の方法で得た非還元性糖質生成酵素及び 6 単位の実施例 7-4 の方法で得たトレハロース遊離酵素を加え、48 時間反応させた。反応物を 97℃で 30 分間加熱して酵素を失活させ、50℃、pH 5.0 に調整後、グルコアミラーゼ剤（ナガセ生化学工業製、商品名『グルコチーム』）をアミロース固形分 1 g 当たり 10 単位加え、さらに 40 時間反応させた。斯くして得た反応物を 95℃で 10 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過した後、常法により、活性炭を用いる脱色及びイオン交換樹脂を用いる脱塩により精製し、固形分濃度約 60 % (w/w) まで濃縮して固形分当たりトレハロースを 82.1 % 含むシラップを得た。

【0173】このシラップを実施例 8-3 と同様にしてカラムクロマトグラフィーに供し、固形分当たりトレハロースを約 98 % (w/w) 含む画分を採取し、減圧下で加熱しながら固形分濃度約 85 % (w/w) まで濃縮してシラップを得た。このシラップに、その容量に対して約 2 % (w/v) の無水結晶トレハロースを種晶として加え、攪拌しながら 120℃で 5 分間混合後、プラスチック製バットに分注し、100℃で減圧乾燥して結晶化させた。その後、バットからブロック状物を取り出し、切削機により粉碎したところ、結晶化率約 70 % の無水結晶トレハロースを含む水分含量約 0.3 % (w/w) の固状物を、原料アミロース固形分当たり約 70 % の収率で得た。この固状物を常法にしたがって粉碎し、無水結晶トレハロースを含む結晶性粉末を得た。

【0174】無水結晶トレハロースには含水物の水分を吸収し、トレハロース含水結晶に変わる性質があるので、無水結晶トレハロース含量の高い本品は、水分を含有している飲食物、化粧品及び医薬品をはじめとする各種組成物ならびにそれら組成物の原料及び中間加工物を脱水又は乾燥するための安全で無害な脱水剤として有用である。また、まろやかで上品な甘味を有する本品は、甘味剤、呈味改善剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品及び医薬品をはじめとする組成物一般に有利に配合使用できる。

## 【0175】

【発明の効果】以上説明したように、この発明は、中温域に至適温度を有し、望ましくは、酸性域に至適 pH を有する、新規な非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素の発見に基づくものである。この発明の両酵素は、例えば、斯かる酵素を産生する微生物の培養によりその所望量を得ることができる。また、この発明による両酵素をコードするそれぞれの DNA は、組換え型蛋白質としての両酵素の製造に極めて有用であり、当該 DNA を導入してなる形質転換体を用いる場合にも、この発明の両酵素の所望量を得ることができる。この発明の両酵素は、トレハロースをはじめとするトレハロース構造有する非還元性糖質の中温域・酸性域での製造に有利に用いることができる。とりわけ、中温域・酸性域に至適条件を有する他の糖質関連酵素との併用により糖質

を製造する際には、目的の糖質を極めて効率的に得ることができる。しかも、この発明の両酵素はアミノ酸配列まで明らかにされた酵素であり、飲食物や医薬品への配合使用を前提とする当該非還元性糖質の製造に安心して使用し得る。斯くして得られる非還元性糖質ないしは斯かる非還元性糖質を含む低還元性糖質は、温和で上品な甘味を有し、そして、何よりも、糖質中の還元性基を有しないか又は大幅に低減しているもので、着色や変質の懸念なく飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる実益がある。

【0176】この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する意義のある発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な発明であると言える。

## 【0177】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：756

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Pro	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Leu	Gln	Ile	Ser	Ala	Glu	Phe	Thr	Leu	Phe	1	5	10	15
Asp	Ala	Ala	Arg	Ile	Val	Pro	Tyr	Leu	His	Arg	Leu	Gly	Ala	Asp	Trp	20	25	30	
Leu	Tyr	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Glu	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	His	Gly	35	40	45	
Tyr	Asp	Val	Val	Asp	His	Ser	Arg	Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	50	55	60	
Glu	Gly	Leu	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Ala	Ala	His	Glu	Arg	Gly	Met	Gly	65	70	75	80
Val	Val	Val	Asp	Ile	Val	Pro	Asn	His	Val	Gly	Val	Ala	Thr	Pro	Lys	85	90	95	
Ala	Asn	Arg	Trp	Trp	Trp	Asp	Val	Leu	Ala	Arg	Gly	Gln	Arg	Ser	Glu	100	105	110	
Tyr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Asp	Ile	Asp	Trp	Glu	Phe	Gly	Gly	Gly	Arg	Leu	115	120	125	
Arg	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Glu	Leu	Asp	Ala	Leu	Arg	130	135	140	
Val	Asp	Gly	Asp	Glu	Leu	Val	Tyr	Tyr	Glu	His	Arg	Phe	Pro	Ile	Ala	145	150	155	160
Glu	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Pro	Arg	Glu	Val	His	Asp	Arg	Gln	His	165	170	175	
Tyr	Glu	Leu	Met	Ser	Trp	Arg	Arg	Ala	Asp	His	Asp	Leu	Asn	Tyr	Arg	180	185	190	
Arg	Phe	Phe	Ala	Val	Asn	Thr	Leu	Ala	Ala	Val	Arg	Val	Glu	Asp	Pro	195	200	205	
Arg	Val	Phe	Asp	Asp	Thr	His	Arg	Glu	Ile	Gly	Arg	Trp	Ile	Ala	Glu	210	215	220	
Gly	Leu	Val	Asp	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	His	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Ala				

71			72
225	230	235	240
Pro Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Leu Ala Glu Leu Ala Gln Gly Arg Pro			
	245	250	255
Ile Trp Val Glu Lys Ile Ile Glu Gly Asp Glu Arg Met Pro Pro Gln			
	260	265	270
Trp Pro Ile Ala Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Ala Leu Ala Gly Ile Asp			
	275	280	285
Arg Val Leu Val Asp Pro Ala Gly Glu His Pro Leu Thr Gln Ile Val			
	290	295	300
Asp Glu Ala Ala Gly Ser Pro Arg Arg Trp Ala Glu Leu Val Pro Glu			
305	310	315	320
Arg Lys Arg Ala Val Ala Arg Gly Ile Leu Asn Ser Glu Ile Arg Arg			
	325	330	335
Val Ala Arg Glu Leu Gly Glu Val Ala Gly Asp Val Glu Asp Ala Leu			
	340	345	350
Val Glu Ile Ala Ala Ala Leu Ser Val Tyr Arg Ser Tyr Leu Pro Phe			
	355	360	365
Gly Arg Glu His Leu Asp Glu Ala Val Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala			
	370	375	380
Pro Gln Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ala Val Gly Ala Ala Leu Ala Asp			
385	390	395	400
Pro Gly Asn Pro Ala Ala Leu Arg Phe Gln Gln Thr Ser Gly Met Ile			
	405	410	415
Met Ala Lys Gly Val Glu Asp Asn Ala Phe Tyr Arg Tyr Pro Arg Leu			
	420	425	430
Thr Ser Leu Thr Glu Val Gly Gly Asp Pro Ser Leu Phe Ala Ile Asp			
	435	440	445
Ala Ala Ala Phe His Ala Ala Gln Arg Asp Arg Ala Ala Arg Leu Pro			
	450	455	460
Glu Ser Met Thr Thr Leu Thr Thr His Asp Thr Lys Arg Ser Glu Asp			
465	470	475	480
Thr Arg Ala Arg Ile Thr Ala Leu Ala Glu Ala Pro Glu Arg Trp Arg			
	485	490	495
Arg Phe Leu Thr Glu Val Gly Gly Leu Ile Gly Thr Gly Asp Arg Val			
	500	505	510
Leu Glu Asn Leu Ile Trp Gln Ala Ile Val Gly Ala Trp Pro Ala Ser			
	515	520	525
Arg Glu Arg Leu Glu Ala Tyr Ala Leu Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly			
	530	535	540
Glu Ser Thr Asp Trp Ile Asp Gly Asp Pro Ala Phe Glu Glu Arg Leu			
545	550	555	560
Thr Arg Leu Val Thr Val Ala Val Glu Glu Pro Leu Val His Glu Leu			
	565	570	575
Leu Glu Arg Leu Val Asp Glu Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Ser Asn Gly			
	580	585	590
Leu Ala Ala Lys Leu Leu Gln Leu Leu Ala Pro Gly Thr Pro Asp Val			
	595	600	605
Tyr Gln Gly Thr Glu Arg Trp Asp Arg Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn			
	610	615	620
Arg Arg Pro Val Asp Phe Ala Ala Ala Ser Glu Leu Leu Asp Arg Leu			

73 74

625 630 635 640

Asp Gly Gly Trp Arg Pro Pro Val Asp Glu Thr Gly Ala Val Lys Thr

645 650 655

Leu Val Val Ser Arg Ala Leu Arg Leu Arg Arg Asp Arg Pro Glu Leu

660 665 670

Phe Thr Ala Tyr His Pro Val Thr Ala Arg Gly Ala Gln Ala Glu His

675 680 685

Leu Ile Gly Phe Asp Arg Gly Gly Ala Ile Ala Leu Ala Thr Arg Leu

690 695 700

Pro Leu Gly Leu Ala Ala Ala Gly Gly Trp Gly Asp Thr Val Val Asp

705 710 715 720

Val Gly Glu Arg Ser Leu Arg Asp Glu Leu Thr Gly Arg Glu Ala Arg

725 730 735

Gly Ala Ala Arg Val Ala Glu Leu Phe Ala Asp Tyr Pro Val Ala Leu

740 745 750

Leu Val Glu Thr

755

【0178】

配列番号: 2

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Asp Ile Val Pro Asn His

1 5

【0179】

配列番号: 3

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Gly Thr Thr Gly Tyr Asp

1 5

【0180】

配列番号: 4

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: N末端フラグメント

配列

Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Ser Ala Glu Phe Thr Leu Phe

1 5 10 15

Asp Ala Ala Arg

20

【0181】

75

76

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn Arg Arg Pro Val Asp Phe Ala Ala Ala

1 5 10 15

Ser Glu Leu Leu

20

【0182】

配列番号: 6

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Ala Asn Arg Trp Trp Trp Asp Val Leu Ala Arg Gly Gln Arg Ser Glu

1 5 10 15

Tyr Ala Asp Tyr

20

【0183】

配列番号: 7

配列の長さ: 2268

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

```

CCCCCAGTA CCTACCGCCT TCAGATCTCG GCGGAGTTCA CCCTCTTCGA CGCGGCGCGC 60
ATCGTGCCCT ACCTGCACCG CCTCGGCGCC GACTGGCTGT ACCTCTCGCC GCTGCTCGAG 120
TCCGAGTCGG GCTCCTCGCA CGGCTACGAC GTGGTCGACC ACTCCGCGT CGACGCCGCC 180
CGCGGCGGGC CGGAGGGGCT CGCCGAGCTC TCCCGTGGG CGCACGAGCG CGGCATGGGC 240
GTCGTCGTCG ACATCGTGCC CAACCACGTC GCGCTCGGA CGCCGAAGGC GAACCGCTGG 300
TGGTGGGACG TTCTGGCCCG TGGACAGCGG TCGGAGTACG CCGACTACTT CGACATCGAC 360
TGGGAGTTTC GCGGCGGCAG GCTGCGCCTG CCCGTGCTCG GCGACGGCCC CGACGAGCTC 420
GACGCGCTGA GAGTGGATGG CGACGAGCTC GTCTACTACG AGCACCCTT CCCGATCGCC 480
GAGGGCACCG GCGGCGGCAC CCCGCGCGAG GTGCACGACC GGCAGACTA CGAGCTGATG 540
TCGTGGCGGC GGGCCGACCA CGACCTCAAC TACCGCCGCT TCTTCGCCGT GAACACGCTC 600
GCCGCCGTAC GCGTCGAAGA CCCGCGCGTG TTCGACGACA CCCACCGCGA GATCGGCCGC 660
TGGATCGCCG AGGGCCTCGT CGACGGCCTG CGCGTCGACC ACCCCGACGG GCTGCGCGCC 720
CCCGGCGACT ACCTGCQCG TCTCGCCGAG CTCGCCAAG GCAGGCCGAT CTGGGTCGAG 780
AAGATCATCG AGGGCGACGA GCGGATGCCC CCGCAGTGGC CCATCGCCGG CACCACCGGC 840
TACGACGCGC TGGCCGGGAT CGACCGGGTG CTCGTCGACC CCGCGGGCGA GCATCCGCTC 900
ACCCAGATCG TCGACGAGGC GGCAGGCAGC CCCC GGCGCT GGGCCGAGCT GGTTCGGAG 960
CGCAAGCGGG CCGTCGCCCG CGGCATCCTG AACTCCGAGA TCCGCCGCGT CGCCCGCGAA 1020
CTCGGAGAGG TCGCCGGCGA CGTCGAAGAC GCGCTCGTCG AGATCGCCGC CGCCCTGTCC 1080
GTCTACCGCA GCTACCTGCC GTTCGGGCGC GAGCACCTCG ACGAAGCCGT GGCCGCCGCG 1140
CAGGCCGCGC CCCCCAGCT CGAGGCCGAC CTCGCCGCGC TCGGCGCAGC GCTCGCCGAC 1200

```



77

78

CCGGGCAACC CCGCCGCGCT CCGCTTCCAG CAGACCAGCG GCATGATCAT GGCCAAGGGC 1260  
 GTCGAGGACA ACGCGTCTA CCGCTACCCC CGGCTCACCT CGTGACCGA GGTGGGGGA 1320  
 GACCCGAGCC TGTTCGCGAT CGACGCGGCC GCCTTCCACG CGGCGCAGCG CGACCGCGCC 1380  
 GCGCGGCTGC CCGAGTCGAT GACGACGCTG ACCACCCACG ACACCAAGCG CAGCGAAGAC 1440  
 ACCCGGGCGC GGATCACCGC GCTCGCCGAG GCGCCCGAAC GCTGGCGGCG CTTCCTGACC 1500  
 GAGGTCGGCG GGCTCATCGG AACGGGCGAC CGGGTGCTGG AGAACCTGAT CTGGCAGGCG 1560  
 ATCGTCGGCG CGTGGCCGGC GAGCCGGGAG CGGCTCGAGG CCTACGCGCT GAAGGCCGCG 1620  
 CGCAAGCCG GCGAGTCGAC CGACTGGATC GACGGCGACC CCGCGTTCGA AGAGCGGCTG 1680  
 ACCCGCCTGG TCACGGTCGC CGTCGAGGAG CCGCTCGTGC ACGAGCTGCT CGAGCGGCTC 1740  
 GTCGACGAGC TGACGGCGGC CGGGTACTCC AACGGCCTCG CGGCGAAGCT GCTGCAGCTG 1800  
 CTCGCCCCCG GAACCCCGA CGTGTACCAG GGCACGGAAC GCTGGGACCG GTCGCTGGTG 1860  
 GACCCGACA ACCGTCGCCC CGTGGATTTC GCCGCGGCAT CCGAGCTGCT CGACCGCCTC 1920  
 GACGGCGGCT GCGGCGCGCC CGTCGACGAG ACCGGCGCGG TCAAGACGCT CGTCGTCTCC 1980  
 CGCGCGCTGC GGCTGCGCCG CGACCGGCCC GAGCTGTTC CCGCGTACCA CCCGCTCACG 2040  
 GCGCGCGGCG CGCAGGCCGA GCACCTGATC GGCTTCGACC GCGGCGGCGC GATCGCCCTG 2100  
 GCCACCCGCC TGCCGCTCGG CCTCGCCGCC GCAGGCGGCT GGGGCGACAC GGTGCTCGAC 2160  
 GTCGGCGAGC GGAGCCTGCG CGACGAGCTG ACCGGCCGCG AGGCCCGCGG AGCGGCGGCG 2220  
 GTGGCCGAGT TGTTCCCGA CTACCCCGTC GCCCTGCTGG TGGAGACA 2268

【 0 1 8 4 】

配列番号 : 8

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TTTTTAATA AAATCAGGAG GAAAAAT

28

【 0 1 8 5 】

配列番号 : 9

配列の長さ : 575

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ポリペプチド

配列

Met Asn Arg Arg Phe Pro Val Trp Ala Pro Gln Ala Ala Gln Val Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Val Gly Gln Gly Arg Ala Glu Leu Pro Leu Thr Arg Asp Glu  
 20 25 30  
 Asn Gly Trp Trp Ala Leu Gln Gln Pro Trp Asp Gly Gly Pro Asp Leu  
 35 40 45  
 Val Asp Tyr Gly Tyr Leu Val Asp Gly Lys Gly Pro Phe Ala Asp Pro  
 50 55 60  
 Arg Ser Leu Arg Gln Pro Arg Gly Val His Glu Leu Gly Arg Glu Phe  
 65 70 75 80  
 Asp Pro Ala Arg Tyr Ala Trp Gly Asp Asp Gly Trp Arg Gly Arg Asp  
 85 90 95  
 Leu Thr Gly Ala Val Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr Phe Thr Pro  
 100 105 110  
 Glu Gly Thr Leu Asp Ser Ala Ile Arg Arg Leu Asp His Leu Val Arg  
 115 120 125  
 Leu Gly Val Asp Ala Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly

79

80

130	135	140
Thr His Gly Trp Gly Tyr Asp Gly Val Leu Trp Tyr Ala Val His Glu		
145	150	155
Pro Tyr Gly Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Cys His		
165	170	175
Ala Arg Gly Leu Ala Val Val Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly		
180	185	190
Pro Ser Gly Asn His Leu Pro Asp Phe Gly Pro Tyr Leu Gly Ser Gly		
195	200	205
Ala Ala Asn Thr Trp Gly Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Pro Leu Ser		
210	215	220
Asp Glu Val Arg Arg Tyr Ile Ile Asp Asn Ala Val Tyr Trp Leu Arg		
225	230	235
Asp Met His Ala Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Arg		
245	250	255
Asp Ala Arg Ala Leu His Leu Leu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Val Asp		
260	265	270
Glu Leu Ala Gly Glu Leu Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser		
275	280	285
Asp Leu Asn Asp Pro Lys Leu Ile Arg Ser Arg Ala Ala His Gly Tyr		
290	295	300
Gly Leu Asp Ala Gln Trp Asp Asp Asp Val His His Ala Val His Ala		
305	310	315
Asn Val Thr Gly Glu Thr Val Gly Tyr Tyr Ala Asp Phe Gly Gly Leu		
325	330	335
Gly Ala Leu Val Lys Val Phe Gln Arg Gly Trp Phe His Asp Gly Thr		
340	345	350
Trp Ser Ser Phe Arg Glu Arg His His Gly Arg Pro Leu Asp Pro Asp		
355	360	365
Ile Pro Phe Arg Arg Leu Val Ala Phe Ala Gln Asp His Asp Gln Val		
370	375	380
Gly Asn Arg Ala Val Gly Asp Arg Met Ser Ala Gln Val Gly Glu Gly		
385	390	395
Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Val Leu Leu Gly Pro Phe Thr Pro		
405	410	415
Met Leu Phe Met Gly Glu Glu Trp Gly Ala Arg Thr Pro Trp Gln Phe		
420	425	430
Phe Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Glu Ala Thr Ala Arg Gly		
435	440	445
Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro		
450	455	460
Asp Pro Gln Asp Pro Ala Thr Phe Ala Arg Ser His Leu Asp Trp Ser		
465	470	475
Glu Pro Glu Arg Glu Pro His Ala Gly Leu Leu Ala Phe Tyr Thr Asp		
485	490	495
Leu Ile Ala Leu Arg Arg Glu Leu Pro Val Asp Ala Pro Ala Arg Glu		
500	505	510
Val Asp Ala Asp Glu Ala Arg Gly Val Phe Ala Phe Ser Arg Gly Pro		
515	520	525
Leu Arg Val Thr Val Ala Leu Arg Pro Gly Pro Val Gly Val Pro Glu		

81

82

530

535

540

His Gly Gly Leu Val Leu Ala Tyr Gly Glu Val Arg Ala Gly Ala Ala

545

550

555

560

Gly Leu His Leu Asp Gly Pro Gly Ala Ala Ile Val Arg Leu Glu

565

570

575

【0186】配列番号:10

配列の長さ:6

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Trp Gly Tyr Asp Gly Val

1

5

【0187】配列番号:11

配列の長さ:6

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Asp Val Val Tyr Asn His

1

5

【0188】配列番号:12

配列の長さ:7

配列の型:アミノ酸

配列番号:14

配列の長さ:20

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:N末端フラグメント

配列

Met Asn Arg Arg Phe Pro Val Trp Ala Pro Gln Ala Ala Gln Val Thr

1

5

10

15

Leu Val Val Gly

20

【0191】

配列番号:15

配列の長さ:20

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Ser Arg Ala Ala His Gly Tyr Gly Leu Asp Ala Gln Trp Asp Asp Asp

1

5

10

15

Val His His Ala

20

【0192】

50

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

10

Arg Leu Asp Ala Val His Ala

1

5

【0189】配列番号:13

配列の長さ:7

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn

20

1

5

【0190】

83

84

配列番号: 16

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Asp Glu Asn Gly Trp Trp Ala Leu Gln Gln Pro Trp Asp Gly Gly Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Leu Val Asp  
 20

【0193】

配列番号: 17

配列の長さ: 1725

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

ATGAACCGAC GATTCCCGGT CTGGGCGCCC CAGGCCGCGC AGGTGACGCT CGTCGTGGGC 60  
 CAAGGCCGCG CCGAACTCCC GCTGACCCGC GACGAGAACG GATGGTGGGC TCTTCAGCAG 120  
 CCGTGGGACG GCGGCCCCGA CCTCGTCGAC TACGGCTACC TCGTCGACGG CAAGGGCCCC 180  
 TTCGCCGACC CGCGGTCGCT GCGGCAGCCG CGCGCGTGC ACGAGCTCGG CCGCGAATTC 240  
 GACCCCGCCC GCTACGCGTG GGGCGACGAC GGATGGCGCG GCCGAGACCT CACCGGAGCC 300  
 GTGATCTACG AACTGCACGT CGGCACCTTC ACCCCTGAGG GAACGCTGGA CAGCGCCATC 360  
 CGTCGCCTCG ACCACCTGGT GCGCCTCGGC GTCGACGCGG TCGAGCTGCT GCCCGTCAAC 420  
 GCGTTCAACG GCACCCACGG CTGGGGCTAC GACGGGGTGC TCTGGTACGC GGTGCACGAG 480  
 CCCTACGGCG GCCCGGAGGC GTACCAGCGC TTCGTCGACG CCTGCCACGC CCGCGGCCTC 540  
 GCCGTCGTGC AGGACGTCGT CTACAACCAC CTGGGCCCGA GCGGCAACCA CCTGCCCGAC 600  
 TTCGGCCCCCT ACCTCGGGTC GGGCGCCGCC AACACCTGGG GCGACGCGCT GAACCTCGAC 660  
 GGGCGGCTCT CCGACGAGGT GCGGCGGTAC ATCATCGACA ACGCGGTGTA CTGGCTGCGC 720  
 GACATGCACG CCGACGGGCT GCGGCTCGAC GCCGTGCACG CGCTGCGCGA CGCCCGCGCG 780  
 CTGCACCTGC TCGAAGAGCT CGCCGCCCGC GTCGACGAGC TGGCGGGCGA GCTCGGCCGG 840  
 CCGTGACGC TCATCGCCGA GAGCGACCTG AACGACCCGA AGCTGATCCG CTCCCGCGCG 900  
 GCGCACGGCT ACGGCCTCGA CGCCAGTGG GACGACGACG TGCACCACGC GGTGCACGCC 960  
 AACGTGACCG GCGAGACCGT CGGCTACTAC GCCGACTTCG GCGGGCTCGG CGCCCTCGTC 1020  
 AAGGTGTTCC AGCGCGGCTG GTTCCACGAC GGCACCTGGT CGAGCTTCCG CGAGCGGCAC 1080  
 CACGGCCGGC CGCTCGACCC CGACATCCCG TTCCGCCGGC TCGTCGCCTT CGCGCAGGAT 1140  
 CACGACCAGG TCGGCAACCG AGCGGTCGGC GACCGCATGT CGGCGCAGGT CGGCGAGGGT 1200  
 TCGCTCGCCG CCGCGGCGGC GCTCGTGCTG CTCGGCCCGT TCACCCCGAT GCTGTTTCATG 1260  
 GCGGAGGAGT GGGGCGCGCG CACCCCGTGG CAGTTCTTCA CCTCCACCC CGAGCCCGAG 1320  
 CTGGGGGAGG CGACGGCGCG CGGGCGCATC GCCGAGTTCG CCCGCATGGG CTGGGACCCG 1380  
 GCAGTCGTGC CCGACCCGCA GGACCCGGCC ACCTTCGCCC GCTCGCACCT GGACTGGTCC 1440  
 GAGCCCGAGC GGAACCGCA CGCGGGCCTG CTCGCCCTTCT ACACCGACCT GATCGCGCTG 1500  
 CGGCGCGAGC TGCCGGTCGA TGCGCCGGCG CGCGAGGTGG ATGCCGACGA GGGCGCGGCG 1560  
 GTCTTCGCGT TCAGCCGCGG CCCGCTGCGG GTCACGGTCG CGCTGCGCCC CGGACCGGTC 1620  
 GGGGTGCCCG AGCACGGGGG CCTCGTGCTC GCCTACGGCG AGGTGCGCGC CGGCGCCGCC 1680  
 GGACTGCACC TCGACGGGCC GGGAGCCGCG ATCGTGCGCC TCGAG 1725

【0194】

配列番号: 18

配列の長さ: 23

85

86

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GCSAACCGST GGTGGTGGGA CGT

23

【0195】

配列番号：19

配列の長さ：3252

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：アルスロバクター・スピーシーズ

株名：S34 (FERM BP-6450)

配列の特徴

特徴を表す記号：5' UTR

存在位置：1..742

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：743..3013

特徴を決定した方法：E

配列

ATGCCGACGA CGAACTTGAG CGCGTTCTCG GGCACCCGCG AGAGCGGTCC GCGCACGGCG 60  
 GCGCCCACTG CCACGACGAG CACGATCGCG GCGAGCGCCG CGACGACGGC GACCGGCAGG 120  
 CGCCCTGAT TGCTGGCGAA GGTGAGCAGC ATGAAGACCA CCTCGAGGCC CTCGAGCAAC 180  
 ACACCTTTGA ACGACACGGT GAACGCGTAC CAATCGGAGA CCCCGAACCG GCTCTCGCGC 240  
 CGGGCGCTCT CGGCCGCTC GACCTGACGC CGGAAGGCAG CCTCCTCGTC ACGGAGAGCC 300  
 CTGCGCCCTG CCGCGCGCAG CACCGCCTTG CGCAGCCAGC CGAGCCCGAA GACGAGCAGC 360  
 AACCCGCCGA CGACGAGGCG CAGCACGGCC AGCGGCAGCA GCAGGATCGC GGGACCGACG 420  
 AGCGCGACGG CCGCGGCCAG CACCACCACG GCGACGGCGG CACCTGTCAG CGCCGACCGC 480  
 CAGCTGCGGG TGGCGCCGAC CGCGACGACG ATCGTGGTCG CCTCCACCGC CTCGACCACG 540  
 CAGGCGAGGA ACACGCGCGC GAACAGGGCG ACGGCGGTCA TCGGCCAGC AGACGGTTGA 600  
 CCATCACGGC ACGTAGCGC CATTGCTCAC AGGAAGGGCC AAGACGCCCG CAACGCGGCA 660  
 CCCGTGGACG GCGCGTACCG GCGTGTGACC GATCGTGTCA ACCGGTGGCG CCCGCCCGA 720  
 GCACCTGCGT AGATTGCGCC TC GTG CCC GCC AGT ACC TAC CGC CTT CAG ATC 772  
 Met Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile  
 1 5 10  
 TCG GCG GAG TTC ACC CTC TTC GAC GCG GCG CGC ATC GTG CCC TAC CTG 820  
 Ser Ala Glu Phe Thr Leu Phe Asp Ala Ala Arg Ile Val Pro Tyr Leu  
 15 20 25  
 CAC CGC CTC GGC GCC GAC TGG CTG TAC CTC TCG CCG CTG CTC GAG TCC 868  
 His Arg Leu Gly Ala Asp Trp Leu Tyr Leu Ser Pro Leu Leu Glu Ser  
 30 35 40  
 GAG TCG GGC TCC TCG CAC GGC TAC GAC GTG GTC GAC CAC TCC CGC GTC 916  
 Glu Ser Gly Ser Ser His Gly Tyr Asp Val Val Asp His Ser Arg Val  
 45 50 55  
 GAC GCC GCC CGC GGC GGG CCG GAG GGC CTC GCC GAG CTC TCC CGT GCG 964  
 Asp Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gly Leu Ala Glu Leu Ser Arg Ala  
 60 65 70

87	88
CGC CAC GAG CGC GGC ATG GGC GTC GTC GTC GAC ATC GTG CCC AAC CAC	1012
Ala His Glu Arg Gly Met Gly Val Val Val Asp Ile Val Pro Asn His	
75	80
GTC GGC GTC GCG ACG CCG AAG GCG AAC CGC TGG TGG TGG GAC GTT CTG	1060
Val Gly Val Ala Thr Pro Lys Ala Asn Arg Trp Trp Trp Asp Val Leu	
95	100
GCC CGT GGA CAG CGG TCG GAG TAC GCC GAC TAC TTC GAC ATC GAC TGG	1108
Ala Arg Gly Gln Arg Ser Glu Tyr Ala Asp Tyr Phe Asp Ile Asp Trp	
110	115
GAG TTC GGC GGC GGC AGG CTG CGC CTG CCC GTG CTC GGC GAC GGC CCC	1156
Glu Phe Gly Gly Gly Arg Leu Arg Leu Pro Val Leu Gly Asp Gly Pro	
125	130
GAC GAG CTC GAC GCG CTG AGA GTG GAT GGC GAC GAG CTC GTC TAC TAC	1204
Asp Glu Leu Asp Ala Leu Arg Val Asp Gly Asp Glu Leu Val Tyr Tyr	
140	145
GAG CAC CGC TTC CCG ATC GCC GAG GGC ACC GGC GGC GGC ACC CCG CGC	1252
Glu His Arg Phe Pro Ile Ala Glu Gly Thr Gly Gly Gly Thr Pro Arg	
155	160
GAG GTG CAC GAC CGG CAG CAC TAC GAG CTG ATG TCG TGG CGG CGG GCC	1300
Glu Val His Asp Arg Gln His Tyr Glu Leu Met Ser Trp Arg Arg Ala	
175	180
GAC CAC GAC CTC AAC TAC CGC CGC TTC TTC GCC GTG AAC ACG CTC GCC	1348
Asp His Asp Leu Asn Tyr Arg Arg Phe Phe Ala Val Asn Thr Leu Ala	
190	195
GCC GTA CGC GTC GAA GAC CCG CGC GTG TTC GAC GAC ACC CAC CGC GAG	1396
Ala Val Arg Val Glu Asp Pro Arg Val Phe Asp Asp Thr His Arg Glu	
205	210
ATC GGC CGC TGG ATC GCC GAG GGC CTC GTC GAC GGC CTG CGC GTC GAC	1444
Ile Gly Arg Trp Ile Ala Glu Gly Leu Val Asp Gly Leu Arg Val Asp	
220	225
CAC CCC GAC GGG CTG CGC GCC CCC GGC GAC TAC CTG CGC CGT CTC GCC	1492
His Pro Asp Gly Leu Arg Ala Pro Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Leu Ala	
235	240
GAG CTC GCC CAA GGC AGG CCG ATC TGG GTC GAG AAG ATC ATC GAG GGC	1540
Glu Leu Ala Gln Gly Arg Pro Ile Trp Val Glu Lys Ile Ile Glu Gly	
255	260
GAC GAG CGG ATG CCC CCG CAG TGG CCC ATC GCC GGC ACC ACC GGC TAC	1588
Asp Glu Arg Met Pro Pro Gln Trp Pro Ile Ala Gly Thr Thr Gly Tyr	
270	275
GAC GCG CTG GCC GGG ATC GAC CGG GTG CTC GTC GAC CCC GCG GGC GAG	1636
Asp Ala Leu Ala Gly Ile Asp Arg Val Leu Val Asp Pro Ala Gly Glu	
285	290
CAT CCG CTC ACC CAG ATC GTC GAC GAG GCG GCA GGC AGC CCC CGG CGC	1684
His Pro Leu Thr Gln Ile Val Asp Glu Ala Ala Gly Ser Pro Arg Arg	
300	305
TGG GCC GAG CTG GTT CCC GAG CGC AAG CGG GCC GTC GCC CGC GGC ATC	1732
Trp Ala Glu Leu Val Pro Glu Arg Lys Arg Ala Val Ala Arg Gly Ile	
315	320
CTG AAC TCC GAG ATC CGC CGC GTC GCC CGC GAA CTC GGA GAG GTC GCC	1780
Leu Asn Ser Glu Ile Arg Arg Val Ala Arg Glu Leu Gly Glu Val Ala	

89	335	340	345	90
GGC GAC GTC GAA GAC GCG CTC GTC GAG ATC GCC GCC GCC CTG TCC GTC				1828
Gly Asp Val Glu Asp Ala Leu Val Glu Ile Ala Ala Ala Leu Ser Val				
	350	355	360	
TAC CGC AGC TAC CTG CCG TTC GGG CGC GAG CAC CTC GAC GAA GCC GTG				1876
Tyr Arg Ser Tyr Leu Pro Phe Gly Arg Glu His Leu Asp Glu Ala Val				
	365	370	375	
GCC GCC GCG CAG GCC GCA GCC CCC CAG CTC GAG GCC GAC CTC GCC GCC				1924
Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala Pro Gln Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ala				
	380	385	390	
GTC GGC GCA GCG CTC GCC GAC CCG GGC AAC CCC GCC GCG CTC CGC TTC				1972
Val Gly Ala Ala Leu Ala Asp Pro Gly Asn Pro Ala Ala Leu Arg Phe				
	395	400	405	410
CAG CAG ACC AGC GGC ATG ATC ATG GCC AAG GGC GTC GAG GAC AAC GCG				2020
Gln Gln Thr Ser Gly Met Ile Met Ala Lys Gly Val Glu Asp Asn Ala				
	415	420	425	
TTC TAC CGC TAC CCC CGG CTC ACC TCG CTG ACC GAG GTC GGG GGA GAC				2068
Phe Tyr Arg Tyr Pro Arg Leu Thr Ser Leu Thr Glu Val Gly Gly Asp				
	430	435	440	
CCG AGC CTG TTC GCG ATC GAC GCG GCC GCC TTC CAC GCG GCG CAG CGC				2116
Pro Ser Leu Phe Ala Ile Asp Ala Ala Ala Phe His Ala Ala Gln Arg				
	445	450	455	
GAC CGC GCC GCC CGG CTG CCC GAG TCG ATG ACG ACG CTG ACC ACC CAC				2164
Asp Arg Ala Ala Arg Leu Pro Glu Ser Met Thr Thr Leu Thr Thr His				
	460	465	470	
GAC ACC AAG CGC AGC GAA GAC ACC CGG GCG CGG ATC ACC GCG CTC GCC				2212
Asp Thr Lys Arg Ser Glu Asp Thr Arg Ala Arg Ile Thr Ala Leu Ala				
	475	480	485	490
GAG GCC CCC GAA CGC TGG CGG CGC TTC CTG ACC GAG GTC GGC GGG CTC				2260
Glu Ala Pro Glu Arg Trp Arg Arg Phe Leu Thr Glu Val Gly Gly Leu				
	495	500	505	
ATC GGA ACG GGC GAC CGG GTG CTG GAG AAC CTG ATC TGG CAG GCG ATC				2308
Ile Gly Thr Gly Asp Arg Val Leu Glu Asn Leu Ile Trp Gln Ala Ile				
	510	515	520	
GTC GGC GCG TGG CCG GCG AGC CGG GAG CGG CTC GAG GCC TAC GCG CTG				2356
Val Gly Ala Trp Pro Ala Ser Arg Glu Arg Leu Glu Ala Tyr Ala Leu				
	525	530	535	
AAG GCC GCG CGC GAA GCC GGC GAG TCG ACC GAC TGG ATC GAC GGC GAC				2404
Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly Glu Ser Thr Asp Trp Ile Asp Gly Asp				
	540	545	550	
CCC GCG TTC GAA GAG CGG CTG ACC CGC CTG GTC ACG GTC GCC GTC GAG				2452
Pro Ala Phe Glu Glu Arg Leu Thr Arg Leu Val Thr Val Ala Val Glu				
	555	560	565	570
GAG CCG CTC GTG CAC GAG CTG CTC GAG CGG CTC GTC GAC GAG CTG ACG				2500
Glu Pro Leu Val His Glu Leu Leu Glu Arg Leu Val Asp Glu Leu Thr				
	575	580	585	
GCG GCC GGG TAC TCC AAC GGC CTC GCG GCG AAG CTG CTG CAG CTG CTC				2548
Ala Ala Gly Tyr Ser Asn Gly Leu Ala Ala Lys Leu Leu Gln Leu Leu				
	590	595	600	
GCC CCC GGA ACC CCC GAC GTG TAC CAG GGC ACG GAA CGC TGG GAC CGG				2596

91 92

Ala Pro Gly Thr Pro Asp Val Tyr Gln Gly Thr Glu Arg Trp Asp Arg  
605 610 615

TCG CTG GTG GAC CCG GAC AAC CGT CGC CCC GTG GAT TTC GCC GCG GCA 2644  
Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn Arg Arg Pro Val Asp Phe Ala Ala Ala  
620 625 630

TCC GAG CTG CTC GAC CGC CTC GAC GGC GGC TGG CGG CCG CCC GTC GAC 2692  
Ser Glu Leu Leu Asp Arg Leu Asp Gly Gly Trp Arg Pro Pro Val Asp  
635 640 645 650

GAG ACC GGC GCG GTC AAG ACG CTC GTC GTC TCC CGC GCG CTG CGG CTG 2740  
Glu Thr Gly Ala Val Lys Thr Leu Val Val Ser Arg Ala Leu Arg Leu  
655 660 665

CGC CGC GAC CGG CCC GAG CTG TTC ACC GCG TAC CAC CCG GTC ACG GCG 2788  
Arg Arg Asp Arg Pro Glu Leu Phe Thr Ala Tyr His Pro Val Thr Ala  
670 675 680

CGC GGC GCG CAG GCC GAG CAC CTG ATC GGC TTC GAC CGC GGC GGC GCG 2836  
Arg Gly Ala Gln Ala Glu His Leu Ile Gly Phe Asp Arg Gly Gly Ala  
685 690 695

ATC GCC CTG GCC ACC CGC CTG CCG CTC GGC CTC GCC GCC GCA GGC GGC 2884  
Ile Ala Leu Ala Thr Arg Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ala Ala Gly Gly  
700 705 710

TGG GGC GAC ACG GTC GTC GAC GTC GGC GAG CGG AGC CTG CGC GAC GAG 2932  
Trp Gly Asp Thr Val Val Asp Val Gly Glu Arg Ser Leu Arg Asp Glu  
715 720 725 730

CTG ACC GGC CGC GAG GCC CGC GGA GCG GCG CGC GTG GCC GAG TTG TTC 2980  
Leu Thr Gly Arg Glu Ala Arg Gly Ala Ala Arg Val Ala Glu Leu Phe  
735 740 745

GCC GAC TAC CCC GTC GCC CTG CTG GTG GAG ACA TGAACCGACG ATTCCCGGTC 3033  
Ala Asp Tyr Pro Val Ala Leu Leu Val Glu Thr  
750 755

TGGGCGCCCC AGGCCGCGCA GGTGACGCTC GTCGTGGGCC AAGGCCGCGC CGAACTCCCG 3093  
CTGACCCGCG ACGAGAACGG ATGGTGGGCT CTTCAGCAGC CGTGGGACGG CGGCCCGAC 3153  
CTCGTCGACT ACGGCTACCT CGTCGACGGC AAGGGCCCCCT TCGCCGACCC GCGGTCGCTG 3213  
CGGCAGCCGC GCGGCGTGCA CGAGCTCGGC CGCGAATTC 3252

【0196】

配列番号 : 20

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

ATGCCCGCCA GTACCTACCG CCTTCA

26

【0197】

配列番号 : 21

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TCATGTCTCC ACCAGCAGGG CGACG

25

【0198】



93

94

配列番号 : 22

配列の長さ : 50

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

AATTCTTTTT TAATAAAATC AGGAGGAATC TAGATGTTA CTAGTCTGCA

50

【0199】

配列番号 : 23

配列の長さ : 42

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

GACTAGTAAA CATCTAGATT CCTCCTGATT TTATTAAAA AG

42

【0200】

配列番号 : 24

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

AAATCTAGAT GCCCGCCAGT ACCTACCGCC TTC

33

【0201】

配列番号 : 25

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

AAAAC TAGTT TATCATGTCT CCACCAGCAG GGC

33

【0202】

配列番号 : 26

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

ATCGGTGATG TCGGCGATAT AG

22

【0203】

40

配列番号 : 27

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

GTACTGGCGG GCATATTTTT TCCTCCTGA

29

【0204】

配列番号 : 28

配列の長さ : 31

95

96

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AATCAGGAGG AAAAAATATG CCCGCCAGTA C

31

【0205】

配列番号：29

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCGACGATCT GGGTGAGCGG AT

22

【0206】

配列番号：30

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCGACGAGCA CCCGGTCGAT CC

22

【0207】

配列番号：31

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CARTGGGAYG AYGAYGTNCA YCAYGC

26

【0208】

30

配列番号：32

配列の長さ：2218

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：アルスロバクター・スピーシーズ

株名：S34 (FERM BP-6450)

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：477..2201

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：3S' UTR

存在位置：2202..2218

特徴を決定した方法：E

配列

CTGCAGCTGC TCGCCCCCGG AACCCCCGAC GTGTACCAGG GCACGGAACG CTGGGACCGG 60

TCGCTGGTGG ACCCGGACAA CCGTCGCCCC GTGGATTTCG CCGCGGCATC CGAGCTGCTC 120

GACCGCCTCG ACGGCGGCTG GCGGCCGCC GTCGACGAGA CCGCGCGGT CAAGACGCTC 180

97		98
GTCGTCTCCC GCGCGCTGCG GCTGCGCCGC GACCGGCCCG AGCTGTTCAC CGCGTACCAC	240	
CCGGTCACGG CGCGCGGCGC GCAGGCCGAG CACCTGATCG GCTTCGACCG CGGCGGCGCG	300	
ATCGCCCTGG CCACCCGCCT GCCGCTCGGC CTCGCCGCCG CAGGCGGCTG GGGCGACACG	360	
GTCGTCGACG TCGGCGAGCG GAGCCTGCGC GACGAGCTGA CCGGECGCGA GGCCCGCGGA	420	
CGGCGCGCGC TGGCCGAGTT GTTCGCCGAC TACCCCGTCG CCCTGCTGGT GGAGAC ATG	479	
		Met
		1
AAC CGA CGA TTC CCG GTC TGG GCG CCC CAG GCC GCG CAG GTG ACG CTC	527	
Asn Arg Arg Phe Pro Val Trp Ala Pro Gln Ala Ala Gln Val Thr Leu		
5 10 15		
GTC GTG GGC CAA GGC CGC GCC GAA CTC CCG CTG ACC CGC GAC GAG AAC	575	
Val Val Gly Gln Gly Arg Ala Glu Leu Pro Leu Thr Arg Asp Glu Asn		
20 25 30		
GGA TGG TGG GCT CTT CAG CAG CCG TGG GAC GGC GGC CCC GAC CTC GTC	623	
Gly Trp Trp Ala Leu Gln Gln Pro Trp Asp Gly Gly Pro Asp Leu Val		
35 40 45		
GAC TAC GGC TAC CTC GTC GAC GGC AAG GGC CCC TTC GCC GAC CCG CGG	671	
Asp Tyr Gly Tyr Leu Val Asp Gly Lys Gly Pro Phe Ala Asp Pro Arg		
50 55 60 65		
TCG CTG CGG CAG CCG CGC GGC GTG CAC GAG CTC GGC CGC GAA TTC GAC	719	
Ser Leu Arg Gln Pro Arg Gly Val His Glu Leu Gly Arg Glu Phe Asp		
70 75 80		
CCC GCC CGC TAC GCG TGG GGC GAC GAC GGA TGG CGC GGC CGA GAC CTC	767	
Pro Ala Arg Tyr Ala Trp Gly Asp Asp Gly Trp Arg Gly Arg Asp Leu		
85 90 95		
ACC GGA GCC GTG ATC TAC GAA CTG CAC GTC GGC ACC TTC ACC CCT GAG	815	
Thr Gly Ala Val Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr Phe Thr Pro Glu		
100 105 110		
GGA ACG CTG GAC AGC GCC ATC CGT CGC CTC GAC CAC CTG GTG CGC CTC	863	
Gly Thr Leu Asp Ser Ala Ile Arg Arg Leu Asp His Leu Val Arg Leu		
115 120 125		
GGC GTC GAC GCG GTC GAG CTG CTG CCC GTC AAC GCG TTC AAC GGC ACC	911	
Gly Val Asp Ala Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly Thr		
130 135 140 145		
CAC GGC TGG GGC TAC GAC GGG GTG CTC TGG TAC GCG GTG CAC GAG CCC	959	
His Gly Trp Gly Tyr Asp Gly Val Leu Trp Tyr Ala Val His Glu Pro		
150 155 160		
TAC GGC GGC CCG GAG GCG TAC CAG CGC TTC GTC GAC GCC TGC CAC GCC	1007	
Tyr Gly Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Cys His Ala		
165 170 175		
CGC GGC CTC GCC GTC GTG CAG GAC GTC GTC TAC AAC CAC CTG GGC CCG	1055	
Arg Gly Leu Ala Val Val Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly Pro		
180 185 190		
AGC GGC AAC CAC CTG CCC GAC TTC GGC CCC TAC CTC GGG TCG GGC GCC	1103	
Ser Gly Asn His Leu Pro Asp Phe Gly Pro Tyr Leu Gly Ser Gly Ala		
195 200 205		
GCC AAC ACC TGG GGC GAC GCG CTG AAC CTC GAC GGC CCG CTC TCC GAC	1151	
Ala Asn Thr Trp Gly Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Pro Leu Ser Asp		
210 215 220 225		
GAG GTG CGG CGG TAC ATC ATC GAC AAC GCG GTG TAC TGG CTG CGC GAC	1199	

99

100

Glu Val Arg Arg Tyr Ile Ile Asp Asn Ala Val Tyr Trp Leu Arg Asp	
230	235 240
ATG CAC GCC GAC GGG CTG CGG CTC GAC GCC GTG CAC GCG CTG CGC GAC	1247
Met His Ala Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Arg Asp	
245	250 255
GCC CGC GCG CTG CAC CTG CTC GAA GAG CTC GCC GCC CGC GTC GAC GAG	1295
Ala Arg Ala Leu His Leu Leu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Val Asp Glu	
260	265 270
CTG GCG GGC GAG CTC GGC CGG CCG CTG ACG CTC ATC GCC GAG AGC GAC	1343
Leu Ala Gly Glu Leu Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser Asp	
275	280 285
CTG AAC GAC CCG AAG CTG ATC CGC TCC CGC GCG CAC GGC TAC GGC	1391
Leu Asn Asp Pro Lys Leu Ile Arg Ser Arg Ala Ala His Gly Tyr Gly	
290	295 300 305
CTC GAC GCC CAG TGG GAC GAC GAC GTG CAC CAC GCG GTG CAC GCC AAC	1439
Leu Asp Ala Gln Trp Asp Asp Asp Val His His Ala Val His Ala Asn	
310	315 320
GTG ACC GGC GAG ACC GTC GGC TAC TAC GCC GAC TTC GGC GGG CTC GGC	1487
Val Thr Gly Glu Thr Val Gly Tyr Tyr Ala Asp Phe Gly Gly Leu Gly	
325	330 335
GCC CTC GTC AAG GTG TTC CAG CGC GGC TGG TTC CAC GAC GGC ACC TGG	1535
Ala Leu Val Lys Val Phe Gln Arg Gly Trp Phe His Asp Gly Thr Trp	
340	345 350
TCG AGC TTC CGC GAG CGG CAC CAC GGC CGG CCG CTC GAC CCC GAC ATC	1583
Ser Ser Phe Arg Glu Arg His His Gly Arg Pro Leu Asp Pro Asp Ile	
355	360 365
CCG TTC CGC CGG CTC GTC GCC TTC GCG CAG GAT CAC GAC CAG GTC GGC	1631
Pro Phe Arg Arg Leu Val Ala Phe Ala Gln Asp His Asp Gln Val Gly	
370	375 380 385
AAC CGA GCG GTC GGC GAC CGC ATG TCG GCG CAG GTC GGC GAG GGT TCG	1679
Asn Arg Ala Val Gly Asp Arg Met Ser Ala Gln Val Gly Glu Gly Ser	
390	395 400
CTC GCC GCC GCG GCG GCG CTC GTG CTG CTC GGC CCG TTC ACC CCG ATG	1727
Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Val Leu Leu Gly Pro Phe Thr Pro Met	
405	410 415
CTG TTC ATG GGC GAG GAG TGG GGC GCG CGC ACC CCG TGG CAG TTC TTC	1775
Leu Phe Met Gly Glu Glu Trp Gly Ala Arg Thr Pro Trp Gln Phe Phe	
420	425 430
ACC TCC CAC CCC GAG CCC GAG CTG GGC GAG GCG ACG GCG CGC GGC CGC	1823
Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Glu Ala Thr Ala Arg Gly Arg	
435	440 445
ATC GCC GAG TTC GCC CGC ATG GGC TGG GAC CCG GCA GTC GTG CCC GAC	1871
Ile Ala Glu Phe Ala Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro Asp	
450	455 460 465
CCG CAG GAC CCG GCC ACC TTC GCC CGC TCG CAC CTG GAC TGG TCC GAG	1919
Pro Asp Asp Pro Ala Thr Phe Ala Arg Ser His Leu Asp Trp Ser Glu	
470	475 480
CCC GAG CGG GAA CCG CAC GCG GGC CTG CTC GCC TTC TAC ACC GAC CTG	1967
Pro Glu Arg Glu Pro His Ala Gly Leu Leu Ala Phe Tyr Thr Asp Leu	
485	490 495

101

102

ATC GCG CTG CGG CGC GAG CTG CCG GTC GAT GCG CCG GCG CGC GAG GTG 2015  
 Ile Ala Leu Arg Arg Glu Leu Pro Val Asp Ala Pro Ala Arg Glu Val  
 500 505 510  
 GAT GCC GAC GAG GCG CGC GGC GTC TTC GCG TTC AGC CGC GGC CCG CTG 2063  
 Asp Ala Asp Glu Ala Arg Gly Val Phe Ala Phe Ser Arg Gly Pro Leu  
 515 520 525  
 CGG GTC ACG GTC GCG CTG CGC CCC GGA CCG GTC GGG GTG CCC GAG CAC 2111  
 Arg Val Thr Val Ala Leu Arg Pro Gly Pro Val Gly Val Pro Glu His  
 530 535 540 545  
 GGG GGC CTC GTG CTC GCC TAC GGC GAG GTG CGC GCC GGC GCC GCC GGA 2159  
 Gly Gly Leu Val Leu Ala Tyr Gly Glu Val Arg Ala Gly Ala Ala Gly  
 550 555 560  
 CTG CAC CTC GAC GGG CCG GGA GCC GCG ATC GTG CGC CTC GAG 2201  
 Leu His Leu Asp Gly Pro Gly Ala Ala Ile Val Arg Leu Glu  
 565 570 575  
 TGACGCGGCT GGGTACC 2218

【0209】

配列番号 : 33

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

ATGAACCGAC GATTCCCGGT CTGGG

25

【0210】

配列番号 : 34

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TCACTCGAGG CGCACGATCG CGGCT

25

【0211】

配列番号 : 35

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

AAATCTAGAT GAACCGACGA TTCCCGGTCT GGGCGC

36

【0212】

配列番号 : 36

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

AAACTAGTT TATCACTCGA GCGCAGCAT CGCGGC

36

【0213】

配列番号 : 37

103

104

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

ATCGTCGGTT CATATTTTTT CCTCCTGA

28

【0214】

配列番号: 38

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

AATCAGGAGG AAAAAATATG AACCGACG

28

【0215】

配列番号: 39

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

AGGTGGTTGT AGACGACGTC CT

22

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の非還元性糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 2】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の非還元性糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【図 3】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の非還元性糖質生成酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 4】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の非還元性糖質生成酵素の安定性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【図 5】本発明による組換え DNA『pGY1』の制限酵素地図である。図中太線はアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の塩基配列を示す。太線の領域内の黒色矢印は本発明の非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列を、斜線矢印は本発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列をそれぞれ示す。

【図 6】本発明による組換え DNA『pGY2』の制限酵素地図である。図中太線はアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の塩基配列を示す。太線の領域内の黒色矢印は本発明の非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列を示す。

【図 7】本発明による組換え DNA『pGY3』の制限

酵素地図である。図中黒色矢印は、本発明の非還元性糖質生成酵素をコードするアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の塩基配列を示す。

【図 8】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 9】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

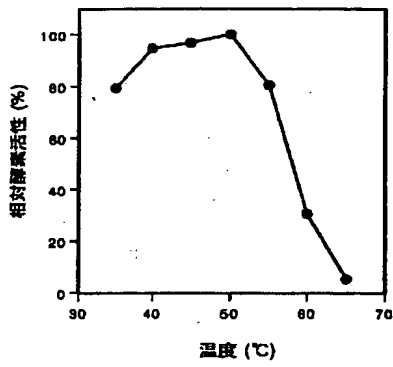
【図 10】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 11】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす pH の影響を示す図である。

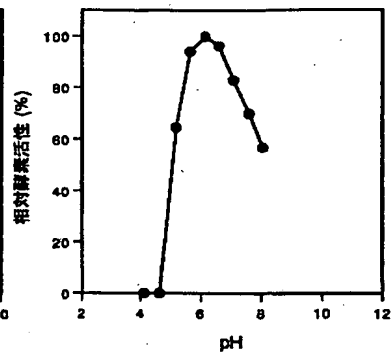
【図 12】本発明による組換え DNA『pGZ2』の制限酵素地図である。図中太線はアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の塩基配列を示す。太線の領域内の斜線矢印は本発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列を示す。

【図 13】本発明による組換え DNA『pGZ3』の制限酵素地図である。図中斜線矢印は、本発明のトレハロース遊離酵素をコードするアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の塩基配列を示す。

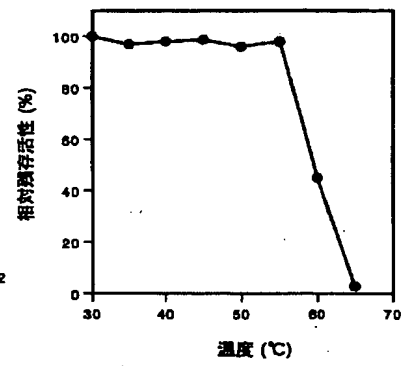
【図 1】



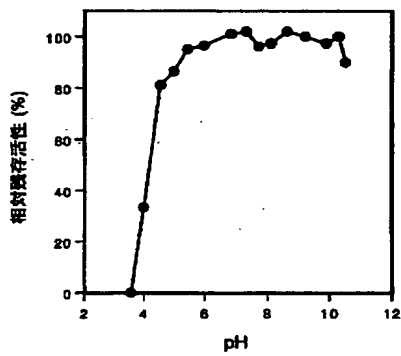
【図 2】



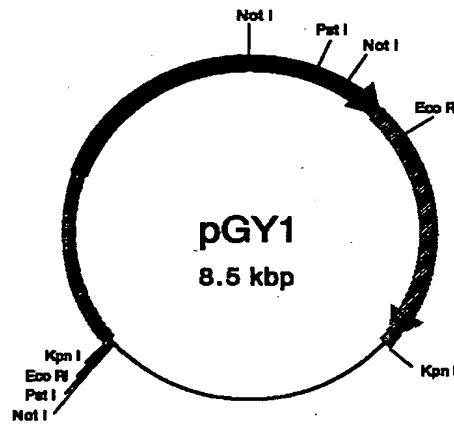
【図 3】



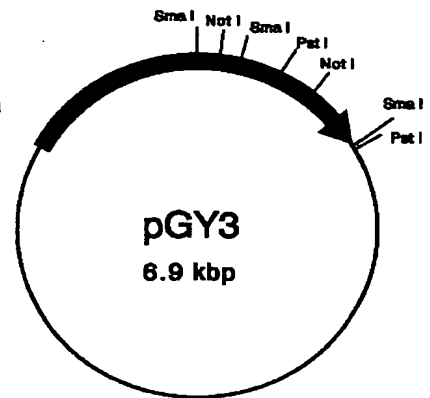
【図 4】



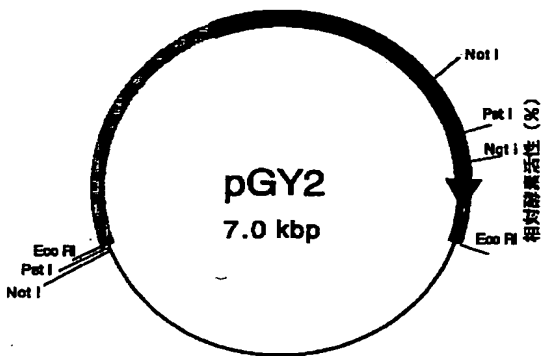
【図 5】



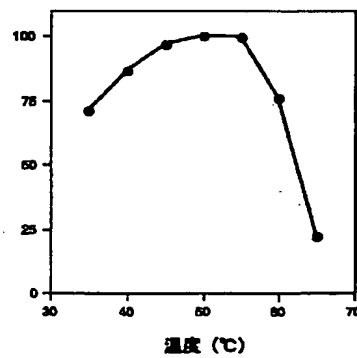
【図 7】



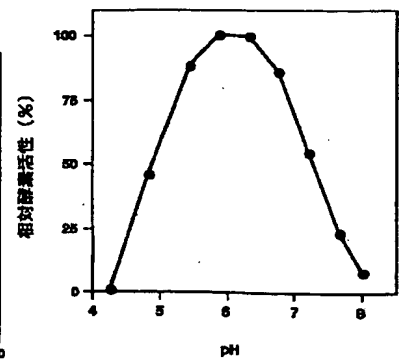
【図 6】



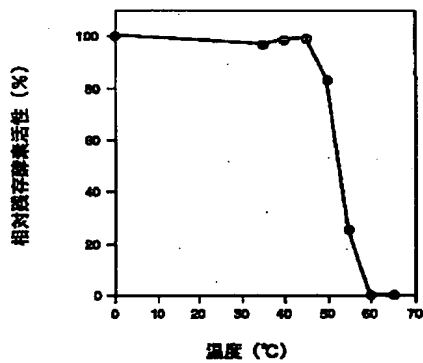
【図 8】



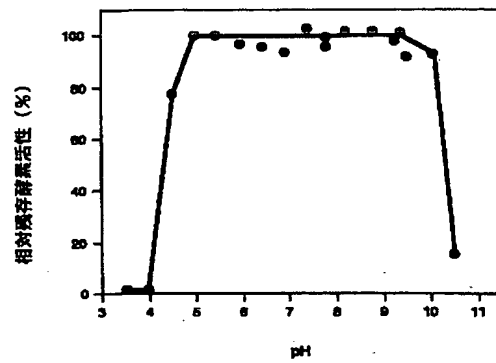
【図 9】



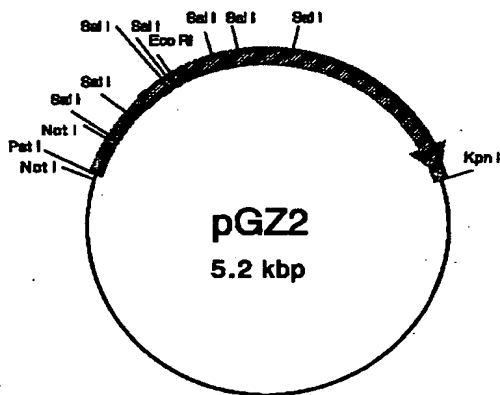
【図 10】



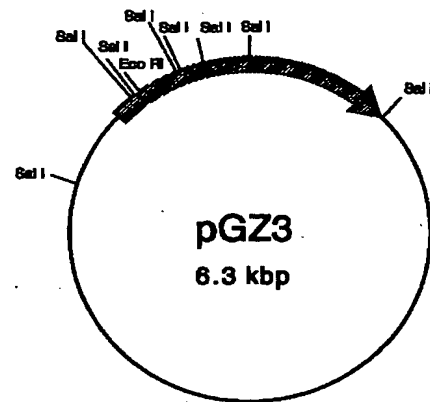
【図 11】



【図 12】



【図 13】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:06)

Z N A

F ターム (参考) 4B024 AA03 AA05 BA07 CA01 DA06  
GA25

4B050 CC01 CC03 DD02 FF03E  
FF04E FF05E FF09E FF11E  
FF12E FF13E FF14E LL05

4B064 AF03 AF04 AG01 CA02 CA19  
CA21 CC24 CE04 CE05 CE06  
CE07 CE11 CE12 DA10

4B065 AA13X CA20 CA21 CA27  
CA41